Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

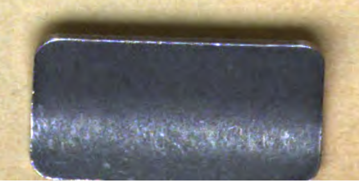
Einundsechzigster Band.

Ausgegeben am 11. April 1914.



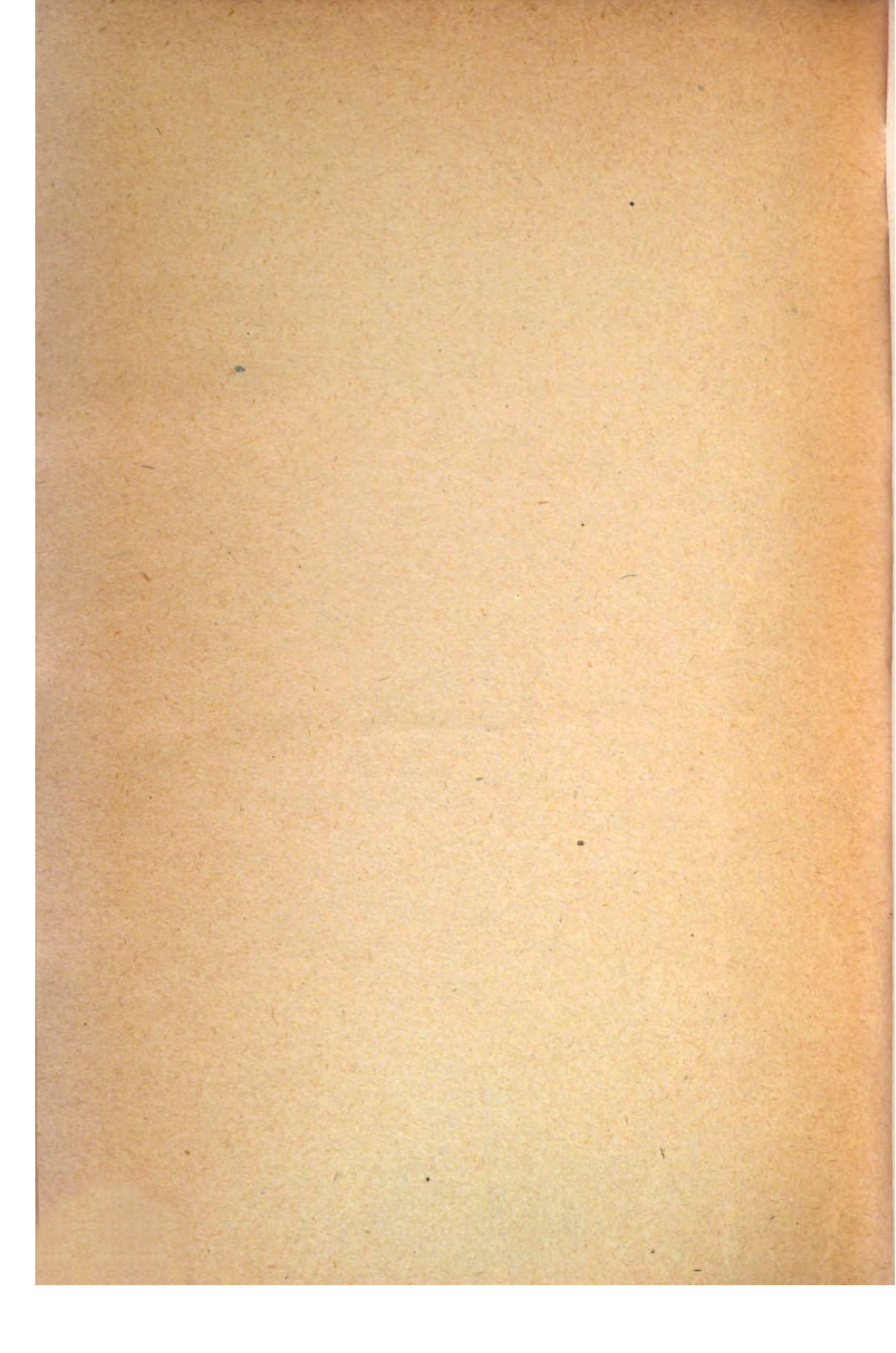
Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1914.






KOSTER BOEKBINDER

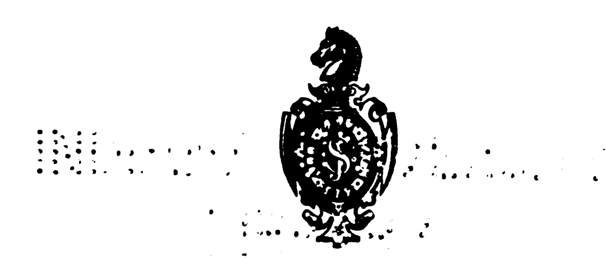




Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Einundsechzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1914.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Synthetische β-Glucoside der Terpenalkohole. IV.[1])

Von

J. Hämäläinen.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Universität Helsingfors.)

(Eingegangen am 23. Februar 1914.)

Glucoside der isomeren Methylcyclohexanole.

Diese Glucoside wurden im Prinzip nach derselben Methode wie die früher beschriebenen dargestellt, d. h. man schüttelt den betreffenden Alkohol, in absolutem Äther gelöst, mit β-Acetobromglucose und Silbercarbonat. Durch Verseifung der entstandenen Acetylverbindung kommt man zu dem entsprechenden Glucosid. Um befriedigende Ausbeuten zu bekommen, muß man einen Überschuß von Alkohol anwenden. Ich habe früher erwähnt, daß, wenn man die Acetobromglucose in 3 bis 4 Portionen zersetzt, man auch mit kleineren Alkoholmengen zum Resultat kommen kann. Es hat sich weiter herausgestellt, daß die Ausbeuten beträchtlich vergrößert werden können, wenn man etwa 2 mal täglich nur 1 g Acetobromglucose zusetzt. Unter Anwendung dieses Kunstgriffes wurden an Tetraacetyl-methylcyclohexanol-glucoside 62 bis 69 % erhalten, während die Ausbeute um nahezu $^3/_4$ herabsank, sobald die anzuwendende Menge der Acetobromglucose auf einmal eingetragen wurde.

Im äußeren Habitus und in Löslichkeitsverhältnissen ähneln sich die drei isomeren Acetylkörper einander sehr. Der Schmelzpunkt ist am höchsten beim (1:3)-Methylcyclohexanol-tetraacetylglucosid (153°), am niedrigsten bei der (1 : 2)-Verbindung (107,5°), während das (1 : 4)-Tetraacetylglucosid bei 145° schmilzt. Bei

[1]) Frühere Mitteilungen: Diese Zeitschr. **49**, 398; **50**, 209 und **53**, 423, 1913.

den entsprechenden Glucosiden steigt sowohl der Schmelzpunkt als die spezifische Drehung mit der Entfernung der Methylgruppe von dem Zuckerreste. Es schmilzt: (1:2) bei 148°, (1:3) bei 162,5°, (1:4) bei 163,5°; die spez. Drehung ist: — 27,80°, — 29,84° und — 38,42° (bei 18° und Na-Licht). Alle drei Glucoside sind empfindlich sowohl gegen Mineralsäuren als auch gegen Emulsin.

(1:2)-Methylcyclohexanol-tetraacetyl-d-glucosid.

$CH_3 . C_6H_{10}O . C_6H_7O_5(COCH_3)_4$.

Zu der Lösung von 20 g (1:2)-Methylcyclohexanol in 100 ccm absolutem Äther wurden 8 g frischbereiteten, mit Alkohol und Äther gewaschenen Silbercarbonats eingetragen, dann 2 mal täglich während 10 Tage mit je 1 g Acetobromglucose versetzt und auf der Schüttelmaschine bei Zimmertemperatur geschüttelt. Am 4. Tage wurden noch 12 g Silbercarbonat zugesetzt.

Die trübe Lösung wurde durch ein doppeltes Filter filtriert und der Äther verjagt, wobei der Rückstand krystallinisch erstarrte. Derselbe wurde vom überschüssigen Methylcyclohexanol durch Wasserdampf befreit. Der nichtflüchtige Rest erstarrte beim Abkühlen zu einer bräunlichen, krystallinischen Masse, die mit Aceton aufgenommen wurde. Beim Verdunsten der Lösung kam der Acetylkörper in schönen, glänzendweißen Nadeln heraus. Zur Reinigung wurden dieselben aus siedendem, verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Ausbeute an recht reiner Substanz 13,5 g oder, auf die angewandte Menge der Acetobromglucose berechnet, 62,5% der Theorie.

Die Analyse ergab:

0,1210 g Substanz gaben 0,2528 g CO_2 und 0,0758 g H_2O.

Ber. für $C_{21}H_{32}O_{10}$ (444,256):	Gef.;
C = 56,72%	56,98%
H = 7,26%	6,96%

Das Tetraacetylglucosid krystallisiert in langen, glänzendweißen Nadeln, schmilzt bei 107,5° (korr.) zu einer farblosen Flüssigkeit, löst sich sehr leicht in Aceton, Methylalkohol, Benzol, Äther, Chloroform, Essigester, schwerer in kaltem Äthylalkohol, sehr schwer in Petroläther und kochendem Wasser, praktisch gar nicht in kaltem Wasser.

(1 : 2)-Methylcyclohexanol-d-glucosid.

$CH_3.C_6H_{10}O.C_6H_{11}O_5.$

Zur Abspaltung der Acetylgruppen wurden 2 g Tetraacetylglucosid in 40 ccm Alkohol gelöst und in die Lösung von 8 g frisch umkrystallisiertem, wasserhaltigem Bariumhydroxyd in 120 ccm Wasser allmählich unter Umrühren eingetragen. Der Acetylkörper fiel hierbei milchig aus. Die Emulsion wurde unter zeitweiligem Schütteln ca. 24 Stunden bei 50 bis 60° gehalten. Dann war alles in Lösung gegangen. Die warme Lösung wurde mit Kohlensäure gesättigt, vom ausgeschiedenen Bariumcarbonat abfiltriert und im Vakuum zur Trockne verdampft. Der farblose, krystallinische Rückstand wurde zur Entfernung von Bariumresten mit absolutem Alkohol ausgekocht und das Filtrat unter vermindertem Druck verdunstet. Hierbei blieb eine weiße Krystallmasse zurück. Zur völligen Reinigung wurde das Glucosid aus siedendem Essigester umkrystallisiert, woraus es krystallwasserfrei herauskommt. Ausbeute an reiner Substanz fast quantitativ.

Die Analyse ergab:

0,1010 g Substanz gaben 0,2086 g CO_2 und 0,0791 g H_2O.

Ber. für $C_{13}H_{24}O_6$ (276,192):	Gef.:
C = 56,48 %	56,33 %
H = 8,76 %	8,70 %

Das wasserfreie Glucosid bildet farblose, sehr bitter schmeckende, zu kugelförmigen Aggregaten verwachsene Nädelchen, schmilzt bei 148° (korr.) zu einer farblosen Flüssigkeit, löst sich sehr leicht in Wasser und Methylalkohol, leicht in Äthylalkohol und Aceton, schwer in kaltem Essigester, Äther, Chloroform und Benzol, fast gar nicht in Petroläther.

Optische Drehung:

Substanz: 0,1519 g; Gesamtgewicht der alkoholischen Lösung: 10,2415 g; $d\ ^{20}/_4 = 0{,}7939$; $p = 1{,}4688$; $l = 1$ dcm; $\alpha = -0{,}33^0$ (bei 18° und Na-Licht).

$$[\alpha]_D^{18^\circ} = -27{,}80^0.$$

Mit verdünnten Mineralsäuren gekocht, wird das Glucosid leicht gespalten. Durch Emulsin wird es bei 37° in 24 Stunden nahezu quantitativ hydrolysiert.

(1:3)-Methylcyclohexanol-tetraacetyl-d-glucosid.

$CH_3 . C_6H_{10}O . C_6H_7O_5(COCH_3)_4$.

Das Tetraacetylglucosid wurde unter Anwendung von genau denselben Mengen von Methylcyclohexanol, Acetobromglucose und Silbercarbonat und auf dieselbe Weise wie das vorige dargestellt. Ausbeute 14,8 g oder, auf die angewandte Menge der Acetobromglucose berechnet, 68,5% der Theorie.

0,1200 g Substanz gaben 0,2487 g CO_2 und 0,0773 g H_2O.

Ber. für $C_{21}H_{32}O_{10}$ (444,256):	Gef.:
C = 56,72%	56,52%
H = 7,26%	7,16%

Der Acetylkörper bildet farblose, glänzende Nädelchen, schmilzt bei 153° (korr.) zu einer farblosen Flüssigkeit und zeigt etwa dieselben Löslichkeitsverhältnisse wie der vorige.

(1:3)-Methylcyclohexanol-d-glucosid.

$CH_3 . C_6H_{10}O . C_6H_{11}O_5$.

2 g Tetraacetylglucosid wurden in obiger Weise durch Baryt verseift. Zur völligen Reinigung wurde das Glucosid aus kochendem Essigester umkrystallisiert. Ausbeute beinahe quantitativ.

Die Analyse ergab:

0,0994 g Substanz gaben 0,2062 g CO_2 und 0,0782 g H_2O.

Ber. für $C_{13}H_{24}O_6$ (276,192):	Gef.:
C = 56,48%	56,58%
H = 8,76%	8,74%

Das wasserfreie Glucosid bildet farblose, sehr bitter schmeckende, zu Kugeln verwachsene Nädelchen, schmilzt bei 162,5° (korr.) zu einer farblosen Flüssigkeit und zeigt dieselben Löslichkeitsverhältnisse wie das vorige.

Zur optischen Bestimmung wurde das Glucosid in absolutem Alkohol gelöst.

Substanz: 0,1534 g; Gesamtgewicht der Lösung: 10,9918 g; $l = 1$ dcm; $p = 1,3947$; $d\ ^{20}/_4 = 0,7930$; $\alpha = -0,33^0$ (bei 18° und Na-Licht).

$$[\alpha]_D^{18^\circ} = -29,84^\circ.$$

Von verdünnten Mineralsäuren wird das Glucosid in der Siedehitze rasch gespalten. Durch Emulsin tritt in 24 Stunden bei 37° nahezu totale Hydrolyse ein.

(1:4)-Methylcyclohexanol-tetraacetyl-d-glucosid.

$CH_3 . C_6H_{10}O . C_6H_7O_5(COCH_3)_4$.

Diese Verbindung wurde in obiger Weise dargestellt. Ausbeute 14,9 g oder, auf die angewandte Menge der Acetobromglucose berechnet, 69 % der Theorie.

Die Analyse ergab:

0,1202 g Substanz gaben 0,2513 g CO_2 und 0,0761 g H_2O.

Ber. für $C_{21}H_{32}O_{10}$ (444,266):	Gef.:
C = 56,72 %	57,03 %
H = 7,26 %	7,03 %

Das Tetraacetylglucosid krystallisiert in glänzendweißen, biegsamen Nadeln, schmilzt bei 145,5° (korr.) zu einer farblosen Flüssigkeit und zeigt etwa dieselben Löslichkeitsverhältnisse wie die vorigen.

(1:4)-Methylcyclohexanol-d-glucosid.

$CH_3 . C_6H_{10}O . C_6H_{11}O_5$.

3 g Tetraacetylglucosid wurden in obiger Weise verseift. Das Glucosid wurde aus siedendem Essigester umkrystallisiert. Ausbeute gut.

0,1001 g Substanz gaben 0,2073 g CO_2 und 0,0790 g H_2O.

Ber. für $C_{13}H_{24}O_6$ (276,192):	Gef.:
C = 56,48 %	56,48 %
H = 8,76 %	8,77 %

Zur optischen Bestimmung wurde das wasserfreie Glucosid in absolutem Alkohol gelöst.

Substanz: 0,1515 g; Gesamtgewicht der Lösung: 10,7530 g; $p = 1,4089$; $d\,^{20}/_4 = 0,7943$; $l = 1$ dcm; $\alpha = -0,43°$ (bei 18° und Na-Licht).

$$[\alpha]_D^{18°} = -38,42°.$$

Das wasserfreie Glucosid bildet glänzendweiße, sehr bitter schmeckende, zu Warzen verwachsene Nädelchen, schmilzt bei 163,5° (korr.) zu einer farblosen Flüssigkeit und zeigt etwa dieselben Löslichkeitsverhältnisse wie die vorigen.

Sowohl verdünnte Mineralsäuren als Emulsin spalten das Glucosid leicht.

Bei der Ausführung dieser Versuche wurde ich von Herrn stud. chem. K. A. Ståhlberg und Fräulein provisor Laine Rundqvist auf das beste unterstützt.

Über heterologe Antisera.

Von

J. Forssman und J. Fex.

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Lund, Schweden.)

(Eingegangen am 28. Februar 1914.)

In seiner Mitteilung über heterologe, durch Injektionen von Meerschweinchen-, Pferde- oder Katzennieren bei Kaninchen erhaltene hammelhämolytische Sera hat Forssman gezeigt, daß solche Sera von den homologen, durch Injektionen von gewöhnlichem Hammelblute gewonnenen hammelhämolytischen Sera verschieden sind. Erstens lösen nämlich jene nicht wie diese Ochsenblut auf, und zweitens werden jene Hammelhämolysine von Meerschweinchen-, Pferde- und Katzennieren ausgiebig spezifisch gebunden, während das bei den homologen Hammelhämolysinen entweder gar nicht oder sehr unbedeutend der Fall ist[1]).

Von allen Seiten ist es nun bestätigt worden, daß die heterologen Hammelhämolysine Ochsenblut nicht auflösen und auch betreffs der Bindung ist Verschiedenheit zwischen den beiden Hämolysinen konstatiert worden. Orudschiew[2]), der Forssmans Angaben nachgeprüft hat, hat, allerdings unter Verwendung einer anderen Methode bei den Bindungsversuchen als Forssman, in seinen Versuchen meist eine, im Gegensatz zu Forssman, bemerkenswerte, wenn auch partielle Bindung von dem gewöhnlichen Hammelhämolysin an die erwähnten Organe gefunden, aber auch er hat gesehen, daß der Grad dieser Bindung variabel war, und hat weiter solche „Hammelblutimmunsera untersucht, bei denen sich ein Verlust an hämolytischer Amboceptorwirkung nach dem Digerieren mit Nieren-

[1]) Diese Zeitschr. 37, S. 96 und 100.

[2]) Zeitschr. f. Immun.-Forsch. 16.

zellen nicht oder nur in geringstem Maße nachweisen ließ". In der letzten Zeit haben Doerr und Pick[1]) noch eine Verschiedenheit zwischen diesen beiden hammelhämolytischen Sera gefunden. Sie wiesen nämlich nach, daß nur die heterologen Hammelhämolysine von gekochten Hammelblutkörperchen völlig gebunden werden, während die homologen hierdurch „nur partiell oder unter Umständen gar nicht" verankert werden, daß also gekochte Hammelblutkörperchen sich ganz so den beiden Hämolysinen gegenüber verhalten wie die oft erwähnten Organe.

Es sind nach alledem genug Beweise für die Verschiedenheit zwischen den heterologen und den gewöhnlichen homologen Hammelhämolysinen vorgebracht, wodurch natürlich nicht verneint wird, daß eine partielle Übereinstimmung vorkommt; da die Antikörper also verschieden sind, müssen auch ihre Antigene verschieden sein.

Nun folgern aber Doerr und Pick aus ihren eben erwähnten Bindungsversuchen, daß der hammelhämolysinbindende Bestandteil der Organe mit dem der gekochten Hammelblutkörperchen wahrscheinlich identisch ist. Da sie Anhänger der Seitenkettenhypothese sind und demnach glauben, daß Antikörperbindung und -bildung demselben Körper angehören, so sagen sie, daß „das koktostabile Antigen" in den Blutkörperchen „mit dem Antigen in den Organen wahrscheinlich identisch ist"; und damit würde also das heterologe Hammelhämolysin und das homologe, aber durch Injektionen von gekochten Hammelblutkörperchen erhaltene Hammelhämolysin identisch sein.

Daß man auch wirklich durch Injektionen von so behandelten Hammelblutkörperchen ein hammelhämolytisches Serum bekommt, das mit dem durch Organinjektionen erzeugten hammelhämolytischen Serum identisch ist, haben Sachs und Nathan[2]) sich bemüht zu zeigen. Dadurch, wenn dies gelänge, wäre natürlich die Identität der Receptoren — der Antigene — in gewissen Tierorganen und in gekochtem Hammelblut noch wahrscheinlicher. Sieht man jetzt zu, welchen Weg Sachs und Nathan betreten haben, um den gewünschten Beweis liefern zu können, so besteht er darin, daß sie nachgewiesen haben, daß die durch gekochtes Hammelblut erhaltenen hammelhämo-

[1]) Diese Zeitschr. 50.

[2]) Zeitschr. f. Immun.-Forsch. 19.

lytischen Sera ebensowenig wie die heterologen Ochsenblut auflösen. Daß diese Beobachtung richtig ist, davon haben wir uns durch mehrere eigene Versuche überzeugt, aber dies genügt noch lange nicht, die Identität der Hämolysine sicherzustellen. Es ist zwar eine sehr bemerkenswerte Übereinstimmung, aber eine Fülle von anderen Eigenschaften können verschieden sein, und es ist ersichtlich, daß, solange wir nicht verstehen, die resp. Antigene und Antikörper rein darzustellen, es fast nie gelingen kann, die Identität mit Sicherheit festzustellen.

Da nun zwar sowohl Doerr und Pick wie Sachs und Nathan für die Identität der hammelhämolytischen Antigene in gewissen Organen und in gekochtem Hammelblut eingetreten sind, schien es uns nötig, die Frage von einer anderen Seite zu untersuchen, denn an diese Identität haben wir nie geglaubt. In diesem Punkte sagt Forssman[1]): „Fragt man nun weiter, ob die Bindung der Sera an die Meerschweinchen-, Katzen- und Pferdenierenemulsionen mit der Bindung der Sera an Blutkörperchen (Hammelblut) identisch ist, so kann man diese Frage kaum anders als verneinend beantworten, denn ein Bejahen derselben müßte mit sich führen, daß gemeinsame und dazu sehr spezifische Substanzen so verschiedener Tiere wie Schaf, Katze, Pferd und Meerschweinchen unter Überspringen diesen Tieren nahestehender Arten wie Ochs und Ratte zukommen würde.“ Jetzt können wir späteren Untersuchungen gemäß noch einige Tiere ebenso wie Paratyphusbacillen der Liste zufügen, was unsere Meinung nur verstärkt; hingegen ist keine Tatsache hinzugekommen, die uns veranlaßt hat, den angegebenen Standpunkt zu verändern. Friedberger hat auch ganz dieselbe Einwendung gegen die supponierte Identität ausgesprochen.

In der Diskussion über diese Identität der Antigene spielen die Bindungsergebnisse eine große Rolle. Man soll die Bedeutung derselben jedoch nur nicht zu hoch schätzen, sondern muß sich immer erinnern, daß wir gar nicht wissen, was die Bindung bedeutet, ob sie eine chemische oder, wie z. B. Landsteiner meint, eine zustandsspezifische Erscheinung ist. Bei den heterologen Hammelhämolysinen sagt nun allerdings Orudschiew, daß

---

[1]) Diese Zeitschr. 37, 111.

alles in bester Übereinstimmung mit der Seitenkettenhypothese steht und daß also Antikörperbildung und -bindung parallel verlaufen. Das ist doch aber nicht immer der Fall. Diejenigen Ausnahmen, wo mit derselben Menge Leberemulsion, die keine Bindung aufwies, eine bedeutend über die normalen Grenzen gehende Hämolysinbildung ausgelöst wurde[1]), sind sicher, und neulich hat E. Weil[2]) ähnliche Verhältnisse bei gekochten Hammelerythrocyten und den durch Injektionen derselben bei Meerschweinchen hervorgerufenen Hammelhämolysinen beobachtet.

Um nun die Identität der hammelhämolytischen Antigene bei Meerschweinchennieren und bei gekochten Hammelblutkörperchen zu prüfen, haben wir gekochte Hammelblutkörperchen bei Meerschweinchen injiziert. Wir wissen nämlich durch Forssmans, Orudschiews und Doerrs und Picks frühere Arbeiten, daß Meerschweinchen- oder Pferdenieren keine heterologen Hammelhämolysine bei Meerschweinchen bewirken. Wären nun die beiden besprochenen Antigene identisch, so würden auch die gekochten Hammelerythrocyten keine Hammelhämolysinbildung hervorrufen. Nachdem diese Versuche schon fertig waren, sind drei Arbeiten, nämlich von E. Weil[3]), von Friedberger-Schiff[4]) und von Schiff[5]), publiziert worden, die, demselben Gedankengang folgend, auch wie wir bei Meerschweinchen gekochtes Hammelblut injiziert haben, um die eventuelle Hämolysinbildung zu studieren. Da unsere Versuche in einigen Beziehungen die anderen vervollständigen, wollen wir, ungeachtet unser Resultat nicht vom Resultate der genannten Verfasser abweicht, doch unsere Ergebnisse mitteilen.

E. Weil benutzte für seine Injektionen 3 mal gewaschene und $^1/_2$ Stunde im Wasserbade gekochte Hammelerythrocyten, Fr. Schiff eine $100^0/_0$ige Aufschwemmung von Hammelblut, die 15 Minuten gekocht worden war. (Bei Friedberger und Schiff findet man keine detaillierten Angaben.) Sowohl Weil wie

[1]) Forssman, diese Zeitschr. 37, 102.
[2]) Diese Zeitschr. 58.
[3]) Diese Zeitschr. 58.
[4]) Berliner klin. Wochenschr. 1913, S. 2328.
[5]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 19.

Schiff erhielten bei allen den von ihnen mit gekochtem Hammelblut injizierten Meerschweinchen Hammelhämolysin in solcher Menge, daß die Sera von 20 bis 100wertig waren[1]. Da es zwar nicht selten vorkommt, daß normale Meerschweinchensera Hammelblut gegenüber 10wertig sind und vielleicht noch ein wenig höhere Werte angetroffen werden können, scheint es uns zweifelhaft, ob man den 20 bis 30wertigen Sera große Bedeutung beilegen kann. Da aber auch ein 100wertiges unter diesen Sera vorkommt, so halten wir es dadurch bewiesen, daß auch durch gekochtes Hammelblut Hammelhämolysine bei Meerschweinchen hervorgerufen werden können.

Sowohl Weil wie Schiff haben aber hierbei eine andere Technik als diejenige, welche Sachs und Nathan in ihren obenerwähnten Versuchen anwandten, benutzt. Sachs und Nathan digerierten nämlich Hammelblut mit dem doppelten Quantum destilliertem Wasser, die ganze Menge wurde dann auf 0,85% besalzen und dann 1 Stunde lang im Wasserbade gekocht.

Aus Erfahrung wissen wir, daß eine wenn auch unbedeutende Modifikation in der Technik immer eine Diskussion herbeiführt. Deshalb befolgten wir in unseren Versuchen genau die von Sachs und Nathan angegebene Technik.

Mit in dieser Weise behandeltem Hammelblut wurden 2 Meerschweinchen gleichzeitig und mit demselben Materiale intraperitoneal injiziert und jedes bekam zweimal mit 8tägigem Intervalle eine Menge, die 4 ccm Vollblut entsprach. 9 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere entblutet und ihre Sera bei 56° inaktiviert, und mit 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement Hammelblut, Ziegenblut und Ochsenblut gegenüber geprüft. Dabei zeigte sich, daß das eine Serum gar kein Hämolysin weder Hammelblut noch anderen Blutarten gegenüber gab, während das andere für Hammelblut 1000wertig, für Ziegenblut 330wertig war, aber Ochsenblut gar nicht auflöste.

Hier haben wir erstens als Resultat der Injektionen vom gekochten Hammelblut ein Serum, das viel stärker ist als irgendeines von denen, die Weil und Schiff bekommen haben. Zweitens sehen wir, daß kein Ochsenhämolysin hier vorkommt.

---

[1]) Als Serumwerte sind hier und überall die reziproken Werte der gefundenen Immunkörperdosen bezeichnet, die zusammen mit 0,10 ccm Meerschweinchenserum oder einem anderen passenden Serum als Komplement eben vollständige Hämolyse von 1 ccm 5% Blutaufschwemmung bei 37° in 1 Stunde geben.

Die letztgenannte Tatsache wäre ohne jede Bedeutung, wenn, wie Schiff sagt, das Hammel-Meerschweinchenserum — also das durch Injektion von gewöhnlichem, ungekochtem Hammelblut erhaltene Serum — auf Rinderblut nicht lytisch wirkte. Dann wäre es natürlich zu erwarten, daß auch das durch gekochtes Hammelblut erzeugte hammelhämolytische Serum Ochsenhämolysin entbehren würde. Es verhält sich aber jedenfalls nicht immer so wie Schiff sagt. Das kann man schon aus Weils Arbeit sehen, wo die Sera von allen vier mit normalem Hammelblut injizierten Meerschweinchen Ochsenblut auflösten. Aus Schiffs Publikation kann man allerdings nicht genau ersehen, wie hochwertig seine mit ungekochtem Hammelblut erhaltenen hammelhämolytischen Sera gewesen sind. In den Versuchen 3 und 5 (S. 344 und 346) hat er jedoch wahrscheinlich seine besten Sera benutzt und diese sind nur $\left(\frac{2 \times 0{,}40}{2 \times 50} = 0{,}008\right)$ 125 wertig. Die vier entsprechenden Sera von Weil sind dagegen alle über 400 wertig (siehe Weils Versuch 4, S. 261, wo alle binnen 15 Minuten vollständige Hämolyse in Dosis von 0,0025 bewirken). Diese lösen Rinderblut erst in Dosen von 0,2 bis 0,1 ccm. Da ein solches Verhältnis zwischen Hammel- und Ochsenhämolysin in diesen Sera hervortritt, ist es klar, daß Schiffs Sera zu minderwertig gewesen sind, um überhaupt ein Urteil über das Vorkommen von Ochsenhämolysin in Hammel-Meerschweinchensera zu erlauben. Da es nun also durch Weil bewiesen ist, daß solche Sera, wenn sie nur nicht zu minderwertig sind, im allgemeinen Ochsenhämolysin enthalten, so kann es von Interesse sein zu sehen, ob beim Kochen das ochsenhämolytische Antigen des Hammelblutes beim Meerschweinchen wie beim Kaninchen wegfällt. Betreffs dieser Frage hat Weil ein Serum gesehen, das Rinderblut kaum weniger intensiv als Hammelblut auflöste: ein wirkliches Unikum von hammelhämolytischen Sera, die doch sonst immer Rinderblut viel schwächer als Hammelblut lösen. Wenn man von dieser einzig stehenden Ausnahme absieht, haben weder Weil noch Schiff so hochwertige, durch gekochtes Hammelblut erhaltene hammelhämolytische Sera gehabt, daß, wenn man das obenerwähnte Verhältnis zwischen Hammelhämolysin und Rinderhämolysin be-

rücksichtigt, man sich äußern kann, ob hammelhämolytische Sera dieser Art Rinderhämolysine enthalten oder nicht. Das geht aber bei unserem 1000 wertigen Serum, und hier sehen wir auch, daß kein Rinderhämolysin entwickelt ist.

Wir haben also gefunden, daß in Übereinstimmung mit Weil hochwertiges Hammelhämolysin bei Meerschweinchen durch Injektion von gekochtem Hammelblut gebildet wird und daß Hammelblut durch Kochen sein Ochsenhämolysinantigen auch beim Meerschweinchen verliert.

Wie Weil folgern auch wir hieraus, daß das hammelhämolytische Antigen der Organe und das Antigen des gekochten Hammelblutes verschieden sind.

Aus Forssmans, Orudschiews, Doerrs und Picks Arbeiten wissen wir ja, daß das hammelhämolytische Antigen der Organe gewisser Tiere bei diesen selben Tieren unwirksam ist, und das einzige Tier, wo man bisher dies Antigen mit positivem Erfolge geprüft hat, ist das Kaninchen. Es muß doch von Wert sein, zu untersuchen, ob das Antigen auch bei anderen Tieren wirkt oder ob es nur bei diesem einzigen Tiere, beim Kaninchen, imstande ist, eine Antikörperbildung auszulösen. Für solche Versuche haben wir zwei Tierarten ausgewählt, von denen die eine, die Ziege, gewöhnliches hammelhämolytisches Antigen besitzt (beim Immunisieren mit Ziegenblut entsteht bekanntlich nebst Ziegenhämolysin Hammelhämolysin in großer Menge, und also enthält das Ziegenblut hammelhämolytisches Antigen), während die andere, die weiße Ratte, solches und überhaupt hammelhämolytisches Antigen ganz entbehrt[1]).

Wie längst bekannt ist, erhält man bei Ziegen nach Einspritzen von Hammelblut Hammelhämolysine. Daß auch Ratten imstande sind Hammelhämolysine zu produzieren, ist wahr-

[1]) Es ist uns ganz unmöglich, Friedbergers und Schiffs (Berl. klin. Wochenschr. **1913**, 1557) Deutung ihrer Versuche über Immunisieren mit Rattennieren beizustimmen, wo sie sagen, daß Rattennieren zweifellos eine deutliche Titersteigerung (des Hammelhämolysins) hervorrufen. In diesen Versuchen sind die Sera nicht über die normalen Variationen des Titers herausgekommen, und wie Forssman (l. c. S. 25) gezeigt hat, kommen ebenso große Schwankungen in ebenso kurzer Zeit bei normalen Tieren ohne etwaige Eingriffe aus bisher unbekannten Ursachen vor.

scheinlich, da wir aber keine Angaben darüber in der Literatur auffinden konnten, mußten wir zunächst uns vergewissern, daß dies gelingt.

Von zwei weißen Ratten erhielt jede 2 ccm Hammelblutkörperchen intraperitoneal 4 mal in 5 tägigen Intervallen; 7 Tage nach der letzten Injektion wurden sie entblutet. Die eine gab dabei ein ungefähr 4000 wertiges, die andere ein 330 wertiges hammelhämolytisches Serum, aber weder das eine noch das andere löste in Dosis von 0,1 ccm Ochsenblut. (Beide Sera waren bei 56° aktiviert und mit 0,1 Meerschweinchenserum als Komplement geprüft.)

Also gibt auch die weiße Ratte reichliche Mengen Hammelhämolysine nach Injektionen von Hammelblut.

Da es hiermit bewiesen war, daß auch die Ratte für unsere Zwecke verwendbar war, haben wir sowohl normales Rattenserum als normales Ziegenserum betreffs ihres Gehaltes an Normalhammelhämolysinen untersucht. 4 Ziegen und 5 weiße Ratten wurden in dieser Beziehung geprüft. Die Ziegensera wurden teils aktiv, gleich nach den Aderlässen, teils bei 55° inaktiviert und mit 0,1 Meerschweinchenserum als Komplement verwendet. In Dosen von 0,05 bis 0,5 ccm wurde dabei keine Hämolyse von 1 ccm 5%igem Hammelblut gefunden. Ganz ähnlich verhielten sich auch die Rattensera, die zwar nur in Dosen von 0,1 bis 0,4 ccm und nur inaktiviert geprüft wurden. (Daß Meerschweinchenserum ein ausgezeichnetes Komplement für Hammelhämolysin, sowohl aus Ziegen wie aus Ratten stammend, ist, davon haben wir uns überzeugt.) Daß man doch möglicherweise solche Ziegen und Ratten antreffen kann, die ein wenig Normalhammelhämolysin in ihrem Serum halten, können wir natürlich hiermit nicht bestreiten. Soviel kann man aber jedenfalls aus den ausgeführten Prüfungen sagen, nämlich *erstens, daß die Sera der untersuchten Tierarten (Ziegen und Ratten) in den benutzten Dosen oft hammelhämolysinfrei sind, und zweitens, wenn wir unsere Erfahrungen über das Vorkommen und die Variation der Normalhämolysine bei anderen Tieren berücksichtigen, daß, falls Hammelhämolysine bei normalen Ziegen und Ratten überhaupt vorkommen, der Gehalt davon dann sehr unbedeutend sein muß.*

7 weiße Ratten haben wir nun mit Meerschweinchennierenemulsion (2 g Niere auf 10 ccm 0,8%ige NaCl-Lösung) intraperitoneal injiziert.

Da man nicht von Tag zu Tag Blutproben bei diesen kleinen Tieren entnehmen kann, um die Hämolysinbildung zu verfolgen, haben wir den Tieren verschiedene Mengen von Emulsion in ungefähr wöchentlichen Intervallen gegeben und dann die Entblutung der Tiere auf verschiedenen Zeitpunkten nach der letztgemachten Injektion vorgenommen, um die Aussicht zu haben, die Nähe des Gipfels der Hämolysinkurve wenigstens einmal zu treffen. Wir geben hier eine tabellarische Übersicht von den behandelten Ratten und von den hierbei gewonnenen Resultaten. Die Sera sind hier und bei den folgenden Rattenversuchen bei 55° inaktiviert und mit 0,1 Meerschweinchenserum als Komplement geprüft.

Tabelle I.

Ratte Nr.	Injektion				Entblutet	Resultat
1	22.X. 3 ccm	29.X. 2 ccm	6.XI. 2,2 ccm	—	13.XI.	0 hämolys.
3	16.XI. 5 „	22.XI. 2 „	25.XI. 1 „	2. XII. 3 ccm	9.XII.	200 wertig
5	29.XI. 1 „	6.XII. 1 „	13.XII. 1 „	—	17.XII.	0 hämolys.
6	„ 2 „	„ 2 „	„ 2 „	—	19.XII.	0 „
7	„ 3 „	„ 2 „	„ 2 „	—	19.XII.	0 „
8	„ 3 „	„ 5 „	„ 5 „	31.XII. 3 ccm	9.I.	7 wertig
9	„ 3 „	„ 3 „	„ 3 „	—	21.XII.	0 hämolys.

Das Serum der Ratte 3 löste Ochsenblut in Dosis von 0,1 ccm nicht.

Bei zwei Ratten haben wir gleichzeitig gekochtes Hammelblut intraperitoneal injiziert (das Blut nach Sachs-Nathan — s. oben — behandelt).

Tabelle II.

Ratte Nr.	Injektion			Entblutet	Resultat
4	18.XI. 4 ccm	26.XI. 2 ccm	3.XII. 2 ccm	9.XII.	100 wertig
10	3.XII. 4 „	10.XII. 3 „	31.XII. 2,5 „	8.I.	7 wertig

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß bei 2 von 7 mit Meerschweinchennierenemulsion injizierten Ratten Hammelhämolysin sich entwickelt hat (bei Ratte 3 in großer Menge, bei Ratte 8 wenig, aber deutlich), und daß demnach das hammelhämolytische Antigen der Meerschweinchennieren auch bei Ratten wirksam ist. Auch mit gekochtem Hammelblut haben wir bei Ratten eine deutliche, wenn auch nicht erhebliche Hammelhämolysinbildung bekommen.

Eine Ziege, deren Serum betreffs seiner hämolytischen Kraft Hammelblut gegenüber mit negativem Resultat geprüft war, wurde mit Meerschweinchennieren (in 0,8%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt und durch Kompreßtuch filtriert) injiziert. Die Mengen von Nierensubstanz (nicht

Emulsion) ebenso wie die durch die Injektionen hervorgerufene Hämolysinbildung gehen aus der folgenden Tabelle hervor.

Tabelle III.

xxxx bedeutet komplette, xxx fast komplette, xx starke, x schwache und 0 keine Hämolyse, Ms. normales Meerschweinchenserum.

Datum	Hämolysinproben		Injektionen
	Serum aktiv	Serum inaktiv + 0,1 Ms.	
27. X.	0,5 ccm = 0 0,1 „ = 0 0,05 „ = 0	0,5 ccm = 0 0,1 „ = 0 0,05 „ = 0	4 g Niere intravenös und 12 g intraperitoneal
6. XI.			12 g Niere intraperit.
13. XI.		0,05 ccm = xxxx 0,01 „ = xxxx 0,005 „ = xxxx 0,001 „ = x	16 g Niere intraperit.
19. XI.	0,5 ccm = 0 0,1 „ = 0 0,05 „ = 0	0,5 ccm = xxxx 0,1 „ = xxxx 0,05 „ = xxxx 0,03 „ = xxxx 0,015 „ = xxxx 0,01 „ = xxx	
25. XI.	0,5 ccm = 0 0,1 „ = 0 0,05 „ = 0	0,05 ccm = xxxx 0,03 „ = xxxx 0,01 „ = xxx	
28. XI.			16 g Niere intraperit.
8. und 17. XII.	0,5 ccm = 0 0,05 „ = 0	0,5 ccm = 0 0,05 „ = 0	

Am 13. XI., also zufälligerweise dann als das Serum am stärksten war, wurde es betreffs seines Gehaltes an Meerschweinchenhämolysin untersucht, um zu konstatieren, daß das Hammelhämolysin nicht ein Nebenhämolysin, sondern das Haupthämolysin war, wie das bei Kaninchen nach Meerschweinchenorganinjektionen der Fall ist. Schon Ziegennormalsera lösen, wie wir gesehen haben, sowohl frisch als inaktiviert, und dann mit Ochsen- oder Schweineblut als Komplement (Meerschweinchen- oder Kaninchenserum hierbei nicht verwendbar) Meerschweinchenblut. Von 4 in dieser Beziehung geprüften Normalsera hämolysierte das stärkste in Dosis von 0,1 ccm 1 ccm 5%iges Meerschweinchweinchenblut vollständig. Das Serum vom 13. XI. gab nun komplette Hämolyse in Dosis von 0,05 ccm, also nur

eine sehr kleine Erhöhung im Vergleich mit den normalen Verhältnissen.

Im Serum vom 13. XI. konnten wir keine Isolysine finden.

Wenn wir nun den obenstehenden Ziegenversuch überblicken, so sehen wir erstens, daß auch bei der Ziege das hammelhämolytische Antigen der Meerschweinchennieren wirksam ist, und wenn wir weiter die kräftige Entwicklung vom Hammelhämolysin mit der geringen Erhöhung des Meerschweinchenhämolysins vergleichen, ist es deutlich, daß auch hier bei der Ziege das Auftreten des Hammelhämolysins keine Nebenerscheinung ist, sondern daß das Hammelhämolysin das Haupthämolysin repräsentiert.

Wie schon anfangs gesagt wurde, wählten wir für diese unsere Versuche zwei Tierarten aus, wovon die eine, die Ratte, von hammelhämolytischem Antigen ganz frei ist, während die andere, die Ziege, ja solches Antigen in ihren Blutkörperchen trägt. Bei beiden Arten hat nun das hammelhämolytische Antigen der Meerschweinchenorgane Hammelhämolysinentwicklung bewirkt, und also stimmt in diesem Punkte dies Antigen mit den gewöhnlichen Antigenen überein, daß es nicht nur bei einer einzigen (Kaninchen), sondern bei mehreren Tierarten seine antigene Wirksamkeit entfaltet.

Aber ebenso wie das hammelhämolytische Organantigen vom hammelhämolytischen Blutantigen unter anderm auch dadurch verschieden sich erwiesen hat, daß es bei denjenigen Tieren, die selbst hammelhämolytisches Organantigen tragen, nicht Hammelhämolysin erzeugen kann, ungeachtet solche Tiere imstande sind, Hammelhämolysin — nach Hammelblutinjektionen — zu bilden, so sehen wir jetzt, daß zwischen Tieren mit Organantigen und denen mit entsprechendem Blutantigen eine prinzipielle Verschiedenheit existiert, indem diese, nicht aber jene Hammelhämolysin nach Organinjektionen produzieren können.

Wenn wir uns dann der Toxizität der heterologen und homologen hammelhämolytischen Sera zuwenden, so haben ja Forssman und Hintze bewiesen, daß sowohl diese wie jene Sera ihre Toxizität für Meerschweinchen nach Digerieren (nicht

nur mit Hammelblut, was Friedberger-Castelli schon gefunden hatten, sondern auch) mit Meerschweinchen- und Katzennieren einbüßen, und daß diese Einwirkung der genannten Organe spezifisch ist, so daß sie nicht z. B. durch Ochsennieren oder Schweinsnieren ausgeübt wird. Diese Beobachtungen sind von allen Seiten bestätigt worden und besonders durch Doerr und Pick weiter ausgebaut. Die toxische Wirkung dieser Sera für Meerschweinchen faßten deshalb Forssman und Hintze so auf, daß die Sera sich mit den Meerschweinchenorganen auch in vivo verbinden, wodurch dann sekundär die Vergiftungserscheinungen ausgelöst werden. Sowohl Sachs und Orudschiew, Sachs und Nathan, wie vor allem Doerr und Pick, welche letztgenannten Verfasser ganz speziell diese Toxizitätsfrage studiert haben, sind derselben Meinung. Wie soll man aber die spezifische Bindung zwischen Sera, die durch Injektionen von Hammelblut oder von Organen von Meerschweinchen, Pferde, Katzen, Schildkröten usw. erhalten werden, und z. B. Meerschweinchenorganen verstehen? Diese auffallende Tatsache wollen Sachs-Orudschiew, Sachs-Nathan und Doerr-Pick als eine Gruppen-, eine Verwandtschaftsreaktion deuten. Da diese Verfasser davon ausgehen, daß die Bindung im Ehrlichschen Sinne aufzufassen ist und daß „das Ergebnis der Bindungsversuche für die Frage der Verwandtschaftsreaktion maßgebend ist", begreift man wohl, daß sie diese Deutung umfassen. Wären ihre Premissen richtig, so wäre auch die Schlußfolgerung sicher, aber sie müssen doch selbst gestehen, daß die Premissen jedenfalls nicht bewiesen und deshalb unsicher sind. Denn worin die Bindung besteht oder was darin liegt, das weiß niemand. Da wir nun sehen, daß Bindung in solchen Fällen vorkommt, wo gar keine Wahrscheinlichkeit vorliegt, von chemischer Verwandtschaft zu sprechen (und die Bindung ist nach Ehrlich ein chemischer Prozeß), so scheint es uns jedenfalls, daß die beim Studium der heterologen Antikörper gefundenen Bindungsergebnisse dazu Veranlassung geben sollten, an der allgemeinen Gültigkeit der Ehrlichschen Auffassung von Bindung zu zweifeln. Man glaubt aber fest, und um von der genannten Auffassung nicht im geringsten abzuweichen, ist man zu der in unseren Augen höchst unwahrscheinlichen Annahme gern bereit, daß gemein-

same und gleichzeitig so spezifische Substanzen, wie hier in Frage kommen, bei einigen wenigen voneinander weit fernstehenden Arten unter Überspringen von nahestehenden Arten vorkommen. Trotzdem nun Forssman seine entgegengesetzte Anschauung deutlich hervorgehoben hat und weder er noch Forssman und Hintze angedeutet haben, daß sie die besprochenen eigentümlichen Bindungsverhältnisse als Verwandtschaftsreaktionen auffassen, hat doch unter anderen auch Friedberger Forssman[1]) als Anhänger dieser Verwandtschaftstheorie angegeben.

Wie unmöglich wir sie finden, ist wohl jetzt klar. Wir glauben vielmehr, daß noch viel Arbeit geleistet werden muß, bevor man diese Bindungsverhältnisse richtig verstehen kann, und daß die Lösung dieser Frage nicht in Übereinstimmung mit der Ehrlichschen Auffassung von Bindung, sondern unabhängig davon zu finden ist.

Nachdem es also sichergestellt war, daß sowohl die gewöhnlichen homologen wie die heterologen hammelhämolytischen Sera ihre Toxizität für Meerschweinchen durch Digerieren mit Meerschweinchen- oder Katzennieren verlieren, wollten Forssman und Hintze prüfen, wie die Giftigkeit der homologen zu der der heterologen Sera und umgekehrt sich verhielt, ob man eine Antianaphylaxie beiden Serumkategorien gegenüber durch Injektionen vom Serum einer Kategorie auslösen konnte, oder ob vielleicht die Antianaphylaxie spezieller war.

Leider hatten Forssman und Hintze aus äußeren Gründen nicht Gelegenheit, diese Frage näher zu untersuchen. Nur ein einziger Versuch wurde ausgeführt, wo sie ein Meerschweinchen mit heterologen, ein anderes mit homologem hammelhämolytischem Serum interperitoneal injizierten, um bei den 24 Stunden nachher vorgenommenen intravenösen Injektionen von heterologem Serum zu finden, daß nur das eine Tier, das heterologes Serum den Tag vorher erhalten hatte, antianaphylaktisch war und überlebte, während das andere ebenso schnell wie das Kontrolltier starb.

Diese Sache haben wir nun unter Anwendung von mehreren Sera und hinreichendem Tiermaterial einer Prüfung gewidmet.

---

[1]) Zeitschr. f. Immun.-Forsch. 18, 3271.

Die Antianaphylaxie erzeugenden ersten Injektionen haben wir hier intravenös gegeben, so wie Friedberger-Castelli[1]) in ihren Versuchen bei Meerschweinchen über Antianaphylaxie bei homologen hammelhämolytischen Sera es getan haben. Wir haben nämlich den Eindruck bekommen, daß man genauere Resultate nach intravenösen als nach intraperitonealen Erstinjektionen erhalten, geschweige daß man viel geringere Serumquantitäten bei jenen spenden muß. Zuerst bestimmten wir die in ungefähr 10 Min. tödliche Dosis, um dann dem Versuchstiere ungefähr ein Drittel dieser Dosis zu geben. Am folgenden Tag wurden die Reinjektionen gemacht, nachdem wir aufs neue die in 10 Min. tödliche Dosis kontrolliert hatten. Bei einem Serum, dem ziegenhämolytischen Kaninchenserum, das sehr toxisch war, wurde die Titrierung nicht scharf genug ausgeführt, weshalb wir ein wenig zu große Dosen bei den Reinjektionen angewandt haben. Da die Schutzwirkung der Erstinjektionen dessenungeachtet deutlich hervortritt, hat diese Überdosierung für die vorliegende Frage keine Bedeutung gehabt.

Für die Versuche benutzten wir nun vier verschiedene hammelhämolytische Sera (alle Kaninchensera). Serum I ist ein heterologes Serum, durch Injektionen von Meerschweinchennieren erhalten; hämolyt. Titer 333 wertig. Serum II ist auch ein heterologes, durch Injektionen von Pferdenieren erhaltenes Serum; hämolyt. Titer 3333 wertig, also zehnmal stärker als Serum I. Serum III haben wir uns durch Hammelblutinjektionen — also ein homologes Serum — verschafft; hämolyt. Titer 3333 wertig. Serum IV ist ein ziegenhämolytisches Serum, also nach Behandlung mit Ziegenblut erhalten; hämolytischer Titer für Hammelblut 3333 wertig.

Die Sera waren alle bei 55° $^1/_2$ Stunde inaktiviert.

Wie aus der folgenden Tabelle ersichtlich ist, wurden von jedem Serum Erstinjektionen bei so vielen Tieren gemacht, daß ein Tier für Reinjektion mit jedem der vier Sera vorausgesehen war; daneben waren auch einige von jedem Serum erstinjizierte in Reserve gehalten, um in zweifelhaften Fällen, wo z. B. die Symptome unsicher waren, Kontrollversuche machen zu können.

Alle die Tiere, die in der umstehenden Tabelle als tot aufgeführt sind, sind unter typischen Respirationsbeschwerden, mit agonalem Lungenödem und mehr oder weniger stark hervortretenden Krämpfen und Zuckungen, also mit typischen anaphylaktischen Symptomen gestorben.

---

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 4.

Tabelle IV.

Nummer	Erste Injektion					Zweite Injektion					
	Datum der Injektion	Gew. d. Tiere g	Dosis d. Serums pro Tier ccm	Dosis d. Serums pro 100 g ccm	Resultat	Datum der Injektion	Gew. d. Tiere g	Injizierte Serumnummer	Dosis d. Serums pro Tier ccm	Dosis d. Serums pro 100 g ccm	Resultat
					Serum I.						
1	5. II.	290	0,50	0,17	Keine Symptome	6. II.	290	Ser. I	2,00	0,70	Keine Symptome
2	5.	320	0,70	0,22	Unruhe, sonst nichts	6.	320	Ser. I	1,65	0,50	do.
3	5.	320	1,00	0,31	Atmung beschleunigt	6.	300	Ser. IV	0,20	0,07	Tot nach 35 Min.
4	5.	330	1,50	0,45	Typische Symptome von Anaphylaxie Tot in 2 Std. 30 Min.						
5	5.	300	0,65	0,22	Keine Symptome	6.	290	Ser. IV	0,20	0,07	Tot nach 15 Min.
6	5.	300	0,65	0,22	do.	6.	280	Ser. III	0,85	0,30	Tot nach 5 Min.
7	5.	340	0,75	0,22	do.	6.	330	Ser. II	1,32	0,40	Tot nach 5 Std.
8	6.	340	1,90	0,55	Tot nach 20 Min.						
9	7.	240	1,44	0,60	Tot nach 8 Min.						
					Serum II.						
10	6. II.	400	0,40	0,10	Keine Symptome	7. II.	390	Ser. II	1,60	0,40	Keine Symptome
11	6.	400	0,×0	0,20	Unruhe	7.	390	Ser. IV	0,28	0,07	Tot nach 30 Min.
12	6.	380	1,15	0,30	Atmung beschleunigt, dann schwierig; erholt sich	7.	380	Ser. II	2,28	0,60	Keine Symptome
13	6.	330	1,32	0,40	Tot nach 5 Min.						
14	6.	260	0,52	0,20	Unruhe	7.	260	Ser. I	1,56	0,60	Atmung beschleunigt. Überlebt.
15	6.	280	0,60	0,20	do.	7.	290	Ser. III	0,87	0,30	do.
16	6.	320	0,65	0,20	do.						
17	7.	270	1,08	0,40	Atmung schwierig. Überlebt.						
18	7.	400	2,00	0,50	Tot nach 2 Std.						
19	7.	380	2,28	0,60	Tot nach 10 Min.						
					Serum III.						
20	5. II.	340	0,40	0,12	Keine Symptome	6. II.	310	Ser. II	1,20	0,40	Keine Symptome
21	5.	350	0,70	0,20	Starke Unruhe, Atmung beschleunigt; erholt sich	6.	340	Ser. I	2,00	0,60	Atmung beschleunigt, schwierig. Überlebt
22	5.	360	1,00	0,30	Tot nach 2 Min.						
23	5.	290	0,35	0,12	Keine Symptome	6.	280	Ser. III	0,85	0,30	Keine Symptome
24	5.	320	0,40	0,12	do.	7.	310	Ser. III	1,86	0,60	Tot nach 15 Min.
25	5.	320	0,40	0,12	do.	6.	310	Ser. IV	0,20	0,07	Tot nach 4 Std.
26	6.	300	0,80	0,26	Tot nach 1 St. 15 Min.						
27	6.	280	0,85	0,30	Tot nach 2 Min.						
28	7.	310	0,90	0,30	Tot nach 4 Min.						
					Serum IV.						
29	6. II.	330	0,10	0,03	Tot nach 2 Std.						
30	6.	280	0,19	0,07	Tot nach 10 Min.						
31	6.	320	0,06	0,02	Atmung beschleunigt	7. II.	310	Ser. III	0,90	0,30	Unruhe, überlebt

Tabelle IV (Fortsetzung).

Nummer	Erste Injektion: Datum der Injektion	Gew. d. Tiere g	Dosis d. Serums pro Tier ccm	Dosis d. Serums pro 100 g ccm	Resultat	Zweite Injektion: Datum der Injektion	Gew. d. Tiere g	Injizierte Serumnummer	Dosis d. Serums pro Tier ccm	Dosis d. Serums pro 100 g ccm	Resultat
32	6. II.	300	0,06	0,02	Atmung beschleunigt	7. II.	290	Ser. II	1,74	0,60	Atmung schwierig, überlebt
33	6.	300	0,06	0,02	do.	7.	300	Ser. I	1,80	0,60	do.
34	6.	300	0,06	0,02	do.	7.	300	Ser. IV	0,20	0,07	Tot nach $1^1/_2$ Std.
35	7.	240	0,16	0,07	Tot nach 8 Min.						
36	16.	270	0,18	0,07	do.						
37	16.	310	0,15	0,05	Tot nach 10 Min.						
38	16.	320	0,13	0,04	Schwere Symptome. Überlebt						
39	16.	300	0,06	0,02	Atmung beschleunigt	17.	300	Ser. IV	0,15	0,05	Unruhe, überlebt
40	16.	300	0,06	0,02	do.	17.	290	Ser. IV	0,15	0,05	do.
41	17.	300	0,15	0,05	Tot nach 20 Min.						

Erstens sehen wir aus dieser Tabelle, daß ein ziegenhämolytisches Serum, das Serum IV, ebenso toxisch für Meerschweinchen ist als irgendein hammelhämolytisches Serum; wie schon bemerkt, war aber dessen hämolytischer Wert 3333 Hammelblut gegenüber; es war also auch ein kräftiges hammelhämolytisches Serum. Natürlich wäre es möglich gewesen, die Toxizität der resp. Sera noch schärfer auszutitrieren, aber im allgemeinen ist die Titrierung scharf genug für unseren Zweck. Bei Serum IV haben wir jedoch, wie schon gesagt, bei den zweiten Injektionen eine zu hohe Dosis genommen, weshalb auch das Tier, das mit Serum IV erstinjiziert war, starb, wenn auch später als das Kontrolltier. Daß man jedoch auch bei diesem Serum durch eine Erstinjektion das Tier vom Tode schützen kann, zeigen die Tiere Nr. 39, 40 und 41. In bezug auf die Toxizität möchten wir hier auf die Veränderung derselben in Serum II vom 6. zum 7. II (Nr. 12, 13, 17, 18, 19) aufmerksam machen. Daraus geht hervor, wie notwendig es ist, von Tag zu Tag die Toxizität zu kontrollieren. Wovon diese Toxizitätserniedrigung abhängt, können wir nicht sagen; aber vielleicht steht sie in Verbindung damit, daß das Serum ganz neu war; das Tier war nämlich erst den 6. II. entblutet. Alle diese vier Sera haben nun eine sehr auffallende

Antianaphylaxie bei Injektion von untertödlichen Dosen gegeben, so daß die injizierten Tiere entweder gar keine Symptome oder sehr unbedeutende Symptome nach der zweiten Injektion desselben Serums zeigten (Nr. 1, 2, 10, 12, 23, 39 und 40), und wir können also in diesem Punkte vollständig Friedberger-Castellis Angaben bestätigen. Bei Steigerung der zweiten Injektion finden wir, daß man oft nicht weit über die einfach tödliche Dosis hinausgehen kann. Friedberger und Castelli sahen, daß 2,3 mal die einfach tödliche Dosis als zweite Injektion tötete, während 1,7 mal (in ihrer Tabelle steht für Tier 672 unrichtig 2 mal) dieselbe Dosis vertragen wurde. Hier sehen wir, daß das Tier (Nr. 24) nach doppelt tödlicher Dosis stirbt und ebenso bei Serum IV nach $^{4}/_{8}$ der tödlichen Dosis (Nr. 34).

Bevor wir über den hier hervortretenden gegenseitigen Schutz dieser Sera uns äußern wollen, möchten wir zunächst darauf aufmerksam machen, daß auch normales Kaninchenserum beim Meerschweinchen eine gewisse Schutzwirkung gegen nachfolgende Injektionen von hammelhämolytischen Kaninchensera aufweist. Folgende Überlegungen haben uns veranlaßt dies anzunehmen und darüber Versuche zu machen. Da es bekannt ist, daß man sowohl durch Pferdenieren wie durch Hammelblut bei Kaninchen ein gleichzeitig hammelhämolytisches und für Meerschweinchen hochtoxisches Serum bekommt, dessen Hammelhämolysine und anaphylaktischen Reaktionskörper an gewissen Meerschweinchenorganen gebunden werden, und daß in normalem Kaninchenserum[1]) ein ganz ähnlich sich verhaltendes Hammelhämolysin vorkommt, so ist es ja sehr naheliegend, anzunehmen, daß das Normalkaninchenserum auch einen normalen anaphylaktischen Reaktionskörper, der wie die eben genannten Antikörper mit Meerschweinchenorganen reagieren soll, enthält. Daß normales Kaninchenserum keine hervortretende Toxizität für Meerschweinchen entfaltet, braucht nicht gegen die Richtigkeit dieser Annahme zu sprechen, denn wenn die toxische Substanz in sehr geringer Menge vorkommt, wird es unmöglich sein, sie unter Anwendung von mittelmäßig großen Serumdosen zu entdecken. Um eine Schutzwirkung gegen eine nachfolgende Injektion zu bewirken, genügt, wie

[1]) Forssman, diese Zeitschr. 37.

Friedberger-Castelli gezeigt haben, dagegen nur ein Bruchteil ($^1/_3$ oder vielleicht noch weniger) der tödlichen Dosis, und da diese Schutzwirkung spezifisch ist, kann man deshalb in dieser Weise das Vorkommen eines solchen Reaktionskörpers in Kaninchennormalserum vielleicht beweisen.

In den hierauf eingerichteten Versuchen haben wir nun gefunden, daß bei Meerschweinchen von 300 bis 320 mg 1,5 ccm normales Kaninchenserum ($^1/_2$ Stunde bei 55° erwärmt) genügt, um vor der eben tödlichen Dosis des Serums IV zu schützen, doch wurden die Tiere nach der Injektion von Serum IV sehr unruhig und schnellatmend. Kleinere Dosen konnten den Tod nicht fernhalten, und durch 0,50 ccm wurde der Tod gar nicht aufgehalten. Mit diesem Normalantikörper verhält es sich aber wie mit den anderen Normalantikörpern, sie variieren von einem Tiere zum anderen, und deshalb ist es wohl möglich, daß noch stärkere Schutzwirkungen bei Kaninchennormalsera vorkommen können als diejenige, die wir gesehen haben[1]). Da nun die Menge des anaphylaktischen Reaktionskörpers in den hier untersuchten hammelhämolytischen Immunsera bedeutend gestiegen ist, denn sie töten doch alle in Dosen, die für Normalsera gar nicht schaden, so muß auch ihre Schutzwirkung höher sein als die der Normaltiere.

Ungeachtet wir nun für die Erstinjektionen eine so hohe Dosis wie $^1/_3$ der tödlichen Dosis gewählt haben, sehen wir doch, daß die gegenseitige Schutzwirkung der Sera (fast) nie vollständig, sondern nur partiell ist. Dies tritt am deutlichsten beim Serum I hervor.

Wenn man dies Serum nämlich mit den Sera II und III vergleicht, findet man, daß jenes Serum eine ausgezeichnete Antianaphylaxie sich selbst gegenüber (Nr. 1, 2) auslöst, die Tiere (Nr. 6, 7) aber, die Reinjektionen mit den Sera II und III bekamen, starben (wenn auch später als die Kontrolltiere), trotzdem sie nicht größere Injektionen erhalten hatten, als daß dieselben Injektionen symptomlos von denjenigen Tieren (Nr. 12, 23) vertragen wurden, die von Serum II resp. III erstinjiziert waren. Serum II schützt auch nicht

[1]) Kraus und Müller (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 8, 418) haben eine ähnliche Schutzwirkung nach intraperitonealen Injektionen von mindestens 4 ccm Kaninchennormalserum beobachtet.

vollständig gegen die Sera I und III, Serum III nicht gegen Serum I. Aus Nr. 20 sieht es zwar so aus, als ob Serum III gegen Serum II vollständig schützte, doch können diesbezügliche unbedeutende Symptome unserer Aufmerksamkeit entgangen sein. Das wahrscheinlichste scheint uns nach diesen Versuchen zu sein, daß immer nur eine partielle gegenseitige Deckung vorkommt.

Durch frühere und diese Untersuchungen wissen wir nun, daß verschiedene hammelhämolytische Kaninchensera, nämlich erstens homologes, zweitens heterologes, durch Injektionen gewisser Organe erhaltenes, und drittens heterologes durch Ziegenblutinjektionen erzeugtes hammelhämolytisches Serum toxisch für Meerschweinchen sind. Um ein tieferes Verständnis dieser heterologen Toxizität zu erreichen, scheint es uns aber nötig, unser Tatsachenmaterial noch zu erweitern, und besonders in zwei Punkten. Bisher ist, wie bekannt, nur hammelhämolytisches Kaninchenserum geprüft; wie verhält sich aber hammelhämolytisches bei anderen Tieren als bei Kaninchen gewonnenes Serum, ist das toxisch oder nicht? Und weiter, von den heterologen hammelhämolytischen Organantisera aus Kaninchen sind allerdings mehrere verschiedene schon geprüft und haben sich alle als mehr oder weniger toxisch erwiesen, aber unter den heterologen hammelhämolytischen Blutantisera aus derselben Tierart ist bis jetzt nur das ziegenhämolytische (Serum IV) untersucht, und dies war ebenso toxisch wie die homologen hammelhämolytischen Kaninchensera. Wie steht es mit der Toxizität anderer heterologer Sera von der letztgenannten Kategorie?

Um die erste Frage zu beantworten, haben wir eine Ziege mit Hammelblut mehrmals interperitoneal injiziert und so ein hammelhämolytisches Serum erhalten. Es war 200wertig für Hammelblut (inaktiviert bei 55° und mit 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement), nicht auto- oder isolytisch. Hiervon (bei 55° $^1/_2$ Stunde inaktiviert) vertrugen Meerschweinchen von 300 g bis 5 ccm intravenös; allerdings wurden sie hierdurch ein wenig schnellatmend, was nicht merkwürdig war, da so große Mengen intravenös einverleibt wurden, in einer $^1/_2$ Stunde aber waren sie ganz munter

und normal. Höhere Dosen wurden nicht geprüft. Gleichzeitig hiermit injizierten wir ein Schaf mit Ziegenblut. Es ist ja so, daß bei allen untersuchten meerschweinchentoxischen Kaninchensera sowohl Hammel- wie Ziegenhämolysin vorkommen. Man kann deshalb ebensogut annehmen, daß die Toxizität von Ziegenantikörpern als von Hammelantikörpern abhängt, und da es uns nicht gelungen war, durch Absorption mit Blutkörpern nur das eine der genannten Hämolysine aus den Kaninchensera zu entfernen, versuchten wir in dieser Weise ein reines ziegenhämolytisches Serum, das nicht auf Hammelblut einwirkte, uns zu verschaffen. Das so erhaltene ziegenhämolytische Serum, das nicht auto- oder isolytisch war, war für Ziegenblut 100wertig. Mit diesem Serum (bei 55° $^1/_2$ Stunde inaktiviert) injizierten wir dann Meerschweinchen von 300 g. Wir konnten, ohne andere Folgen von den Injektionen zu bemerken als einige Schnellatmigkeit, die binnen kurzem weg war, bis 5 ccm intravenös einspritzen. Höhere Dosen wurden nicht geprüft. Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß diese Sera jedenfalls in den benutzten Dosen ungiftig waren. Natürlich können wir daraus nicht mit Bestimmtheit folgern, daß so erhaltene Sera nie toxisch sein können, dazu sind die hier benutzten Sera nicht hochwertig genug, aber, da die Tiere keine Symptome ungeachtet der hohen Dosen zeigten, scheint es uns doch dafür zu sprechen, daß homologe hammelhämolytische Ziegensera für Meerschweinchen nicht oder fast nicht toxisch sind. Wir wollen die Versuche fortsetzen und später darüber berichten.

Um neben dem ziegenhämolytischen (Serum IV) noch ein anderes heterologes hammelhämolytisches Blutantiserum von Kaninchen auf seine Toxizität zu prüfen, wählten wir ein ochsenhämolytisches Kaninchenserum, das für Hammelblut 1410-wertig, also sehr hochwertig, war. Meerschweinchen von 300 g wurden mit je 2 ccm von diesem Serum injiziert, ohne daß die Tiere eben das geringste Symptom einer Anaphylaxie aufwiesen. Hiernach ist klar, daß nicht alle, selbst hochwertige heterologe hammelhämolytische Kaninchensera für Meerschweinchen toxisch sind.

Am Schlusse wollen wir nun unsere hauptsächlichen Ergebnisse zusammenfassen:

1. Bei Meerschweinchen gelingt es. durch gekochtes Hammelblut hochwertige hammelhämolytische Sera zu erzeugen; hieraus folgern wir in Übereinstimmung mit E. Weil, daß die hammelhämolytischen Antigene in gekochtem Hammelblute und in gewissen Tierorganen verschieden sind.

2. Die hammelhämolytischen Organantigene stimmen darin mit anderen Antigenen überein, daß sie nicht nur beim Kaninchen — das einzige Tier, wo man sie bis jetzt mit positivem Resultate geprüft hat — sondern auch bei anderen Tierarten — Ratte und Ziege — Hammelhämolysine erzeugen.

3. Ebenso wie die hammelhämolytischen Organantigene und Blutantigene ungleich sind, so verhalten sich auch diejenigen Tiere, die solche Antigene haben, beim Immunisieren mit Organantigenen verschieden. Beim Meerschweinchen, das ja Organantigen besitzt, kann man also mit Organantigen Hammelhämolysin nicht auslösen, bei der Ziege dagegen, die hammelhämolytisches Blutantigen enthält, gelingt es dagegen, Hammelhämolysin durch Organantigen zu bekommen.

4. Durch intravenöse Injektionen bei Meerschweinchen von untertödlichen Dosen der homologen und heterologen hammelhämolytischen Kaninchensera gelingt es, Antianaphylaxie hervorzurufen, wie schon früher für die homologen meerschweinchentoxischen Kaninchensera Friedberger und Castelli es gesehen haben. Hierbei wirken die Sera gegenseitig, decken einander im allgemeinen, wahrscheinlich immer, nur partiell.

5. Ziegenhämolytisches Kaninchenserum wirkt ebenso toxisch wie homologes hammelhämolytisches Kaninchenserum. Nebst dem ziegenhämolytischen Kaninchenserum, das gleichzeitig auch stark hammelhämolytisch war, haben wir noch ein heterologisches hammelhämolytisches Blutantiserum von Kaninchen, nämlich ein ochsenhämolytisches Kaninchenserum geprüft. Ungeachtet dessen, daß dies Serum stark hammelhämolytisch war, erwies es sich auch in Dosis von 2 ccm als nicht toxisch.

6. Endlich haben wir homologes hammelhämolytisches Serum einer Ziege und homologes ziegenhämolytisches Serum von einem Hammel geprüft, und beide waren auch in Dosen von 5 ccm intravenös für Meerschweinchen nicht toxisch.

Über den Nachweis von Quecksilber im Harn und den Organen nebst Beobachtungen über das Verhalten einiger unlöslicher Quecksilberverbindungen im Organismus.

Von

E. Salkowski.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 28. Februar 1914.)

Bei weiterer Beschäftigung mit dem genannten Gegenstande[1]) habe ich einige Erfahrungen gemacht, die mir der Mitteilung wert erscheinen. Dieselben beziehen sich 1. auf die Zerstörung der organischen Substanz, 2. auf die Herstellung des Quecksilberjodidbeschlages, 3. auf die Sicherheit des Verfahrens.

1. Die Zerstörung der organischen Substanz.

In meiner ersten Mitteilung habe ich, der allgemeinen Angabe folgend, vorgeschrieben, den Harn vor dem Zusatz des Oxydationsmittels und der Salzsäure — anfangs verwendete ich als Oxydationsmittel Wasserstoffsuperoxyd, später Chlorsäure, schließlich Kaliumchlorat — vor dem Zusatz von Salzsäure und Kaliumchlorat bis zur beginnenden Ausscheidung von Salzen einzudampfen.

Es hat sich nun gezeigt, daß ein anderes Verfahren besser zum Ziel führt. Es empfiehlt sich, den Harn n i c h t vorher einzudampfen, sondern ihn von vornherein mit der erforderlichen Quantität Kaliumchlorat und Salzsäure zu versetzen und dann erst einzudampfen, etwa zur Hälfte auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad. Ja, es schien mir, als ob die Zerstörung der organischen Substanz am besten gelänge, wenn man gar nicht auf freiem Feuer erhitzt, sondern von vornherein

---

[1]) Vgl. Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**, 387 und **73**, 401.

auf dem Wasserbad resp. Dampfbad — doch bin ich bezüglich dieses Punktes nicht ganz sicher.

Die Vorzüge dieses Verfahrens, d. h. des Eindampfens mit den Oxydationsmitteln, sind mehrfache. Erstens ist die Zerstörung der organischen Substanz des Harns eine vollkommenere: es gelingt in den meisten Fällen eine hellgelbe „Endlösung" zu bekommen[1]), während dieses bei dem üblichen Verfahren durchaus nicht immer der Fall ist. Nur höchst selten muß man nachträglich noch etwas Salzsäure und Kaliumchlorat hinzusetzen, in keinem Falle aber war es nötig, den beim Eindampfen des Alkoholauszuges bleibenden Rückstand einer nochmaligen Oxydation zu unterziehen, eine Operation, die nicht nur lästig, sondern mitunter auch gefährlich ist durch Eintritt von Explosionen, vermutlich durch Bildung von sehr explosivem Unterchlorsäureester oder Überchlorsäureester, die mindestens Materialverlust herbeiführen können.

Der zweite Vorzug liegt darin, daß man nicht durch „Chlordämpfe" belästigt wird, die natürlich jedesmal bei dem wiederholten Eintragen von Salzsäure und Kaliumchlorat in größerer Menge entstehen und unausgenützt entweichen.

Was die erforderliche Quantität der Reagenzien betrifft, so habe ich für die 24 stündige Quantität des Harns eines Kaninchens von etwa 2 kg oder darüber 7 bis 8 g Kaliumchlorat und 15 ccm Salzsäure von 1,126 D (die zum Neutralisieren oder schwachen Ansäuern des alkalischen Harns erforderliche Quantität nicht mitgerechnet) ausreichend gefunden. Das Kaliumchlorat wird dem Harn zugesetzt, durch leichtes Erwärmen unter Umrühren gelöst, dann die Salzsäure hinzugegeben.

Für 500 ccm menschlichen Harns von etwa 1017 D reichen auch die doppelten Quantitäten bei demselben Verfahren nicht aus, dagegen wurde mit 20 g Kaliumchlorat und 40 ccm Salzsäure ein tadelloses Resultat erhalten — es dürfte auch etwas weniger schon ausreichen.

Sehr angenehm ist bei dem beschriebenen Vorgehen, daß man sich gar nicht um den Verlauf der Oxydation zu kümmern

---

[1]) Das gilt in erster Linie für Kaninchenharn. Unter „Endlösung" verstehe ich die Lösung, in welche die Kupferbleche eingelegt werden, auf denen sich das Quecksilber ausscheidet.

braucht, namentlich wenn man die Abdampfschale von vornherein auf das Dampfbad oder Wasserbad setzt; man kann sicher sein, daß sie zu dem gewünschten Resultat führt und wird, da die Operation natürlich im Digestorium ausgeführt wird, von den Dämpfen von Cl und ClO_2 nicht belästigt.

Ganz ähnlich verfahre ich bei der Verarbeitung von Magen- und Darminhalt, resp. Faeces von Kaninchen.

Durch Verreiben mit Wasser wird ein dünner Brei hergestellt, in diesem das Kaliumchlorat gelöst, das Doppelte der angewendeten Menge Kaliumchlorat Salzsäure von 1,126 D hinzugesetzt und auf dem Wasserbad erhitzt. Sobald die Cellulose grauweiß erscheint, wird filtriert und gründlich nachgewaschen, Filtrat und Waschwasser zuerst auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad eingedampft.

Bestimmte Angaben über die Quantität von $KClO_3$ und Salzsäure lassen sich natürlich nicht machen, es ist wohl stets noch ein nachträglicher Zusatz der Reagenzien erforderlich, und vollständige Entfärbung herbeizuführen, gelingt oft nicht.

Was die Organe betrifft, so habe ich es sehr zweckmäßig gefunden, dieselben vorher einer Pepsinverdauung zu unterwerfen. Für eine (gut zerkleinerte) Kaninchenleber nehme ich etwa 500 ccm Verdauungssalzsäure (490 ccm Wasser, 10 ccm Salzsäure und 1,126 D) und 2 g Pepsin. Nach 3 bis 4tägigem Stehen im Thermostaten wird ohne zu filtrieren $KClO_3$ und Salzsäure hinzugesetzt und eingedampft. Auch hier kann man, wie beim Magen- und Darminhalt, ohne Schaden eine Filtration einschalten. Die Entfärbung ist auch bei wiederholtem Zusatz von $KClO_3$ und HCl schwer zu erreichen.

2. Die Herstellung des Quecksilberjodidbeschlages.

Ob man zur Herstellung desselben Reagenzgläser nimmt oder engere Röhren von 5 bis 6 mm Durchmesser, ist gleichgültig. Die engeren Röhren haben den Vorzug, daß das Quecksilberjodid deutliche mikroskopische Krystalle bildet, was bei der Verbreitung auf die größere Fläche im Reagenzglas in der Regel nicht der Fall ist, andererseits ist aus der engeren Röhre der oft sehr störende Überschuß von Jod schwerer zu entfernen. Natürlich müssen bei Anwendung engerer Röhren die Kupferbleche der Länge nach gefaltet werden. Ich ziehe

Reagenzgläser von etwa 16 bis 17 mm Durchmesser vor. Zweckmäßig ist es, in allen Fällen, in denen das Resultat negativ zu sein seint, das Reagenzglas längere Zeit liegen zu lassen und dann mit schräg nach aufwärts gerichtetem Boden von unten her leicht zu erhitzen. Öfters wird ein minimaler oder zweifelhafter Beschlag dann deutlich. Will man nach meinem Vorschlag das überschüssige Jod durch Einführung des Reagenzglases in einen Kolben mit siedendem Wasser entfernen, so erhitze man nicht unnötig lange, da sich sonst auch ein Teil des Quecksilberjodids verflüchtigen kann.

Ist das Resultat nach etwa 2 stündigem Verweilen der Kupferbleche in der Endlösung negativ, so empfiehlt es sich, der Sicherheit wegen in die abgegossene Endlösung nochmals Kupferbleche einzulegen und bis zum nächsten Tage liegen zu lassen.

Man findet dann häufig die Kupferbleche mehr oder weniger stark angegriffen, auf dem Boden des Schälchens, oft auch auf den Kupferblechen eine bläulichweiße, augenscheinlich aus einem Gemisch von Kupferchlorür und -chlorid bestehende Ausscheidung. Man tut dann gut, die Kupferbleche in ein anderes Schälchen zu übertragen und durch Wasser und Salzsäure möglichst von dem Kupferchlorür und -chlorid zu befreien. Ganz gelingt diese Reinigung selten, und die Gegenwart von Kupferchlorür ist augenscheinlich die Ursache davon, daß sich in dem unteren Teil des Reagenzglases nach dem Erhitzen schwärzliche Streifen von Kupferoxyd finden.

In neuerer Zeit habe ich ein abgeändertes Verfahren zur Herstellung des Quecksilberjodidbeschlages zweckmäßig gefunden, namentlich bei sehr geringem Hg-Gehalt, nämlich das Reagenzglas von vornherein mit ein wenig Joddampf zu versehen und dann erst die Kupferbleche hineinzubringen. Beim Erhitzen erscheint dann sofort der gelbe oder rote Beschlag von Quecksilberjodid. Es ist überraschend, wie wenig Jod zur Bildung des Quecksilberjodids erforderlich ist. Wenn man das Reagenzglas durch Erhitzen einer minimalen Quantität Jod mit Joddampf anfüllt, dann in das noch warme Reagenzglas eine Röhre einführt, die mit der Wasserstrahlpumpe in Verbindung steht, und den Joddampf mit Ausnahme des unteren Drittels oder Viertels aussaugt, so reicht der Rest immer noch zur

Bildung des Quecksilberjodids aus. Man führt die Kupferbleche sofort in das noch warme Reagenzglas ein, natürlich darf es nicht zu heiß sein. Falls der Beschlag nicht allein aus Quecksilberjodid besteht, sondern, der stellenweise grauen Farbe nach zu schließen, auch aus Quecksilber oder Quecksilberjodür, kann man diesen Fehler durch erneute Verdampfung von Jod leicht verbessern. Auf diese Modifikation des Verfahrens bin ich verfallen, weil bei sehr kleinen Mengen Quecksilber der Quecksilberbeschlag manchmal durch mit bräunlicher Farbe wieder angesetztes Jod verdeckt wird und beim Erhitzen durch Entfernung des Jods sich leicht auch etwas Quecksilberjodid verflüchtigen kann.

3. Die Sicherheit des Verfahrens.

Während ich mich früher durch vielfache Kontrollversuche mit Zusatz von Quecksilberchlorid von der Sicherheit des Verfahrens überzeugt habe und auch bei den ausgedehnten Untersuchungen von F. Blumenthal und Oppenheim[1]) das Quecksilber im Harn und den Organen nie fehlte, wo es nach Lage der Dinge zu erwarten war, habe ich neuerdings einige Beobachtungen gemacht, die auf den ersten Blick geeignet schienen, Zweifel an der Zuverlässigkeit des Verfahrens zu erwecken. Ich führe die bezüglichen Versuche im folgenden an.

Versuch 1.

Kaninchen von ca. 2 kg Körpergewicht erhielt bei Fütterung mit Weißkohl an 5 aufeinanderfolgenden Tagen eine in Wasser unlösliche Verbindung von paranucleinsaurem Quecksilber mit Tannin. Bezüglich der Darstellung dieser Verbindung sei folgendes bemerkt.

In meiner Arbeit über die Paranucleinsäure habe ich angegeben[2]), daß eine wässerige Lösung von Paranucleinsäure mit Quecksilberchloridlösung erst bei reichlichem Zusatz eine bleibende Trübung und schließlich einen geringen Niederschlag gibt. In weiterer Verfolgung des Verhaltens der Säure zu Quecksilbersalzen, die ich gemeinschaftlich mit Dr. Tambach ausführte, zeigte sich, daß essigsaures Quecksilber(oxyd) sofort einen reichlichen Niederschlag von paranucleinsaurem Quecksilber gibt. Dieses ist in Lösungen von kohlensauren Alkalien löslich, durch genügenden Alkoholzusatz kann aus dieser Lösung eine Verbindung von paranucleinsaurem Quecksilbernatrium bzw. -kalium niedergeschlagen werden, die sich sehr leicht in Wasser löst. Mit dieser Lösung sind

[1]) u. a. diese Zeitschr. 57, 288, 1913.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 266, 1901.

von **Ferd. Blumenthal** und **Oppenheim**[1]) Versuche über das Verhalten im Organismus, sowie von **Franz Blumenthal**[2]) Heilversuche an mit Syphilis infizierten Kaninchen angestellt worden, die ergaben, daß unter Umständen eine einmalige Injektion von 0,1 g genügt, um große Primäraffekte zur Heilung zu bringen. Die Tanninverbindung erhält man am einfachsten durch Fällung der Lösung des paranucleinsauren Quecksilbernatriums oder -kaliums mit Tanninlösung als gelblichen, in Wasser und verdünnten Säuren unlöslichen Niederschlag. Die Tanninverbindung enthält 6,4% Hg, sie wurde in Form von Tabletten angewendet, von denen jede 0,085 der Verbindung, entsprechend 5,4 mg Hg, enthielt. Die Tabletten wurden zu Pulver zerdrückt und mit etwas gehacktem Kohl, einem Teil der dem Tier verabreichten Quantität (500 g) gemischt. Diese Mischung wurde dem Kaninchen, nachdem es etwa 12 Stunden nichts gefressen hatte, vorgesetzt. Erst wenn es sie verzehrt hatte, was oft zögernd geschah, aber doch so gut wie vollständig, erhielt das Tier sein Futter. Zeigten sich in der Reibschale noch Reste von dem Tablettenpulver, so wurden diese mit etwas Kohl aufgewischt und aufs neue vorgesetzt, falls sie nicht minimal waren. Es wurde immer dieselbe Reibschale, ohne sie auszuwaschen, benutzt, so daß das Kaninchen eine etwa nicht verzehrte Spur der Verbindung am nächsten Tage aufnahm. — Das Tier erhielt am 9. VI. 13 eine halbe Tablette gleich 2,7 mg Hg, ebenso am 10., 11., 12., 13. Die Darmentleerungen waren wie gewöhnlich geformt, die Freßlust unvermindert. Der Harn enthielt, wie stets bei Weißkohlfütterung, Thiosulfat.

Die Untersuchung des Harns vom 9. und 10. auf Quecksilber ergab ein negatives Resultat, in dem Harn der folgenden Tage waren Spuren von Quecksilber nachweisbar.

Versuch 2.

Da die Quantität der zugeführten Quecksilberverbindung doch vielleicht für den Übertritt einer nachweisbaren Quantität Quecksilber in den Harn zu gering war, wurde der Versuch an demselben Kaninchen mit einer etwas größeren Quantität wiederholt und gleichzeitig die stattgehabte Resorption durch Untersuchung der Organe festgestellt.

Das Tier erhielt[3]) am 23. VI. 0,085 g = 5,4 mg Hg, ebenso am 24. u. 25., am 26. 0,1275 g = 8,1 mg Hg, am 27. 0,170 g = 10,8 mg Hg. Das Befinden des Tiers war die ganze Zeit gut, die Freßlust nicht vermindert, der Kot von der gewöhnlichen Beschaffenheit. Am 28. wurde das Kaninchen getötet.

Der Harn vom 23. enthielt kein Quecksilber, vom 24. sehr wenig, vom 25. mehr, aber auch nicht viel, vom 27. viel.

---

[1]) Diese Zeitschr. **57**, 288, 1913.

[2]) Zeitschr. f. Immunitätsforschung u. experim. Ther. **20**, 402, 1913.

[3]) Behufs genauerer Dosierung wurden 10 Tabletten verrieben, das Gewicht genau festgestellt und danach die Dosis berechnet.

Im Mageninhalt fand sich noch reichlich Quecksilber. Die sog. Endlösung wurde auf ein bestimmtes Volumen gebracht, $^1/_{10}$ dann abgenommen und verdünnt. In dieser verdünnten Lösung fand sich noch ziemlich reichlich Hg. Dasselbe gilt für den Darminhalt.

Andererseits erhielt ich auch aus den Nieren eine sehr starke Reaktion, eine etwas geringere aus der Leber.

Es war also ein erheblicher Teil noch nicht resorbiert; wenn dieses aber auch der Fall war, schien mir doch die im Harn gefundene Quantität Hg unverhältnismäßg gering gegenüber dem Befund in der Niere, der zeigt, daß doch immerhin erheblich Quecksilber resorbiert war.

Ich dachte mir, daß vielleicht der reichliche Gehalt des Harns an Thiosulfat[1]) ein Hindernis für den Nachweis des Quecksilbers sein könnte. Um diese Vermutung zu prüfen, versetzte ich den Harn eines andern Kaninchens bei Weißkohlfütterung, der gleichfalls reichlich Thiosulfat enthielt, mit 0,25 ccm einer Quecksilberchloridlösung von 1 $^0/_{00}$, entsprechend ca. 0,19 mg Hg. Aus diesem Harn erhielt ich einen starken Quecksilberjodidbeschlag, die Gegenwart von Thiosulfat im Harn beeinträchtigt also den Quecksilbernachweis nicht.

Zur weiteren Aufklärung der Sachlage wurden einige weitere Versuche mit unlöslichen Quecksilberverbindungen angestellt, zunächst mit einer solchen, die vielfach therapeutisch angewendet wird, von der es also feststeht, daß sie vom Magendarmkanal aus resorbiert wird, nämlich mit cholsaurem Quecksilber. Meine Absicht war, dieses einerseits bei einem Futter zu geben, bei dem das Tier reichlich Thiosulfat ausscheidet, andererseits bei einer Ernährung, bei welcher der Harn frei von Thiosulfat ist.

Versuch 3.

Kaninchen von 1960 g Körpergewicht, Fütterung mit 500 g Weißkohl pro Tag, von dem am ersten Tage nur wenig gefressen wurde, später alles vollständig. Das Kaninchen erhielt am 23. IX. 0,05 g cholsaures Quecksilber gleich ca. 9,8 mg Hg, ebenso am 24., 25., 26., 27., am 28. wurde es getötet.

Das Befinden des Tieres war gut, Darmstörungen nicht vorhanden, Freßlust nicht vermindert. Der Harn vom 23. und 24. enthielt kein Quecksilber, am 25. schien eine Spur vorhanden zu sein, in dem Harn vom 26. und 27. war wieder nichts nachweisbar. Im Magen- und Darminhalt fand sich ziemlich viel Quecksilber, auch in der Leber und den Nieren war es nachweisbar, in letzteren aber auffallend wenig.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 89, 485, 1914.

Versuch 4.

Kaninchen von 1700 g Körpergewicht, vom 6. X. ab mit 500 g Weißkohl pro Tag gefüttert. Am 13. X. erhält das Tier 0,05 cholsaures Quecksilber gleich ca. 9,8 mg Hg in der üblichen Weise mit gehacktem Kohl gemischt. Am 14. dieselbe Quantität, die langsam und augenscheinlich etwas widerwillig aufgenommen wurde. Von seinem Futter fraß das Tier etwa die Hälfte, daher wurde am 15. nur etwa halb soviel Harn vorgefunden, wie an den vorhergehenden Tagen und bei Kohlfütterung überhaupt, bei der die Tiere etwa 450 ccm Harn auszuscheiden pflegen. Am 15. erhält das Kaninchen, dem wahrscheinlich das bitter schmeckende cholsaure Quecksilber den Appetit verdorben hatte, 0,05 cholsaures Quecksilber in Gummi-arabicum-Lösung mit der Schlundsonde, ebenso am 16. Schon am 15. fraß das Tier sein Futter wieder ganz auf.

Sämtliche Harnentleerungen wurden auf Quecksilber untersucht, stets mit negativem Resultat.

Versuch 5.

Dasselbe Kaninchen wurde, nachdem es im Stall mit Hafer und Luzerne gefüttert war, am 22. X. wieder zum Versuch genommen; es sollte mit demselben Futter weiter gefüttert werden, leider aber war Luzerne ausgegangen und Grünfutter überhaupt nicht mehr zu beschaffen. An Stelle desselben versuchte ich Kartoffeln zu setzen, doch fraß es von diesen nur 80 g am ersten Tage, später überhaupt nichts mehr, auch in den folgenden Tagen von dem vorgesetztrn Hafer im ganzen nur 50 g. Da diese Nahrungsaufnahme ungenügend erschien, erhielt das Tier 50 g Milch[1]) mit der Schlundsonde. Am 23. erhielt das Kaninchen 0,05 cholsaures Quecksilber gleich ca. 9,8 mg Hg, auf gehackte Kartoffeln aufgestreut. Es fraß dieselben zögernd, jedoch vollständig auf. Am 24., 25., 26. bekam es dieselbe Dosis mit der Schlundsonde. Das cholsaure Quecksilber wurde zuerst mit etwas Gummi-arabicum-Lösung verrieben, dann mit der Milch vermischt. Die Schlundsonde wurde mit Wasser nachgespült, so daß ein Verlust jedenfalls nur minimal sein kann.

Das Befinden des Tieres war gut, der Kot geformt, die Harnmenge stets gering, am 27. wurde überhaupt kein Harn vorgefunden, ebenso nicht am 28., jedoch ziemlich viel durch Ausdrücken der Blase erhalten.

---

[1]) Laqueur hat kürzlich (Zeitschr. f. physiol. Chem. **84**, 119) über die ausschließliche Ernährung von Kaninchen mit Milch, zum Teil auch mit Milch und Hafer berichtet und die Vorzüge dieser Ernährung bei Stoffwechseluntersuchungen hervorgehoben. Ich kann ihn hier nicht als Autor für diese Ernährung zitieren, da Slowtzoff schon vor längerer Zeit die ausschließliche Ernährung mit Milch (58 Tage lang bei 5 Kaninchen) bei seinen Versuchen über das Verhalten des Xylans im Organismus in meinem Laboratorium angewendet hat (Zeitschr. f. physiol. Chem. **34**, 109, 1901/02). Auf die Vorteile und Nachteile dieser Ernährung und anderer für Stoffwechselversuche an Kaninchen komme ich wohl gelegentlich zurück.

In dem Harn vom 23. war kein Quecksilber nachweisbar, wohl aber im Harn vom 24., 25., 26 und in dem durch Abdrücken erhaltenen Harn vom 27. und 28., die Quantität des Hg stets sehr gering.

Am 28. wurde das Tier getötet. Sowohl im Magen- als auch im Darminhalt fand sich noch ziemlich viel nicht resorbiertes Quecksilber. Die Untersuchung der Leber und der Nieren ergab gleichfalls Quecksilbergehalt, in den Nieren jedoch bedeutend weniger als in den Nieren des Tieres von Versuch 2, das 5,4 bzw. 10,8 mg in Form des Tannats des paranucleinsauren Quecksilbers erhalten hatte.

Durch die Versuche 4 und 5 ist also erwiesen, daß die Ausscheidung von Quecksilber durch den Harn, also mit andern Worten die Resorption, bei demselben Kaninchen und gleichen Dosen desselben Quecksilberpräparates durch die Art der Ernährung beeinflußt werden kann.

Der Sicherheit wegen wurde dieser Versuch noch einmal wiederholt, diesmal mit dem erwähnten Tannat des paranucleinsauren Quecksilbers.

Versuch 6 (a und b).

Kaninchen von 2250 g Körpergewicht wurde am 1. XII. 13 zum Versuch genommen und mit 500 g Mohrrüben pro Tag gefüttert. Am 5. XII. erhielt es 0,085 des Präparates gleich 5,4 mg Hg, am 6., 7. und 8. 0,0425 gleich 2,7 mg Hg. Das Futter wurde gut gefressen, nur am 6, nicht vollständig. Das Befinden des Tieres war gut, der Kot geformt die Harnentleerung wie stets bei Mohrrübenfütterung reichlich, ca. 500 ccm täglich (inkl. Spülwasser).

In dem Harn vom 5. war Quecksilber nachweisbar, zwar schwach, aber deutlich, sehr viel mehr in dem Harn vom 6., dagegen gelang in dem Harn vom 7. und 8. der Nachweis nicht. Die Grenze der Nachweisbarkeit liegt also bei der Fütterung mit Mohrrüben in Form des angewendeten Präparats zwischen 2,7 und 5,4 mg Hg.

Am 9. XII. wurde das Futter gewechselt. Das Kaninchen erhielt nunmehr 500 g Weißkohl, den es begierig fraß. Am 13. erhielt es 0,085 des Präparats gleich 5,4 mg Hg, am 14., 15., 16. je 0,0425 gleich 2,7 mg Hg, genau entsprechend der Versuchsanordnung bei der Fütterung mit Mohrrüben.

Die Untersuchung auf Quecksilber verlief an allen Tagen gänzlich negativ.

Auch diesmal hatte sich also die Resorption abhängig gezeigt von der Ernährung. Da bei den Versuchen mit cholsaurem Quecksilber immerhin der Zufall eine Rolle gespielt haben konnte, wurde noch ein Versuch mit diesem angestellt.

Versuch 7 (a und b).

Kaninchen von 2020 g Körpergewicht, schon längere Zeit vorher mit 500 g Mohrrüben pro Tag gefüttert.

Am 17. I. erhielt das Tier 0,05 cholsaures Hg gleich ca. 9,8 mg Hg mit Brot zu Pillen geformt, eingestopft. — Der Harn vom 17. konnte nicht benutzt werden, da das Kaninchen Durchfall bekommen, außerdem 2 bis 3 halbzerkaute Pillen herausgebracht hatte. Es wurden nun 0,025 cholsaures Hg gleich ca. 4,9 mg Hg zugleich mit 0,4 Tannalbin mit dünnem Amylumkleister in der Reibschale verrieben, diese Mischung, mit Wasser verdünnt, mit der Schlundsonde eingegeben. Ebenso wurde am 18., 19., 20. und 21. verfahren.

Das Präparat wurde, mit Tannalbin gemischt, gut vertragen, der Kot war geformt, die Freßlust nicht vermindert.

Die Untersuchung des Harns auf Quecksilber verlief an sämtlichen Tagen negativ.

Am 22. und 23. erhielt das Tier je 0,05 cholsaures Hg gleich ca. 9,8 mg Hg.

In dem Harn vom 22. war eine Spur Hg nachweisbar, in dem Harn vom 23. ziemlich viel.

Die Grenze der Nachweisbarkeit liegt also beim cholsauren Quecksilber bei günstigem Futter bei ca. 4,9 bis ca. 9,8 mg Hg.

Als dritte unlösliche Quecksilberverbindung benutzte ich das vielfach gebrauchte Quecksilberchlorür, und zwar das offizinelle Hydrargyrum chloratum vapore paratum.

Versuch 8.

Kaninchen von 1910 g Körpergewicht. Fütterung mit 500 g Mohrrüben täglich.

Am 17., 18. und 19. XI. erhielt das Tier täglich 6,4 mg Hg_2Cl_2 gleich 5,4 mg Hg. Dasselbe wurde mit Gummi-arabicum-Lösung verrieben, diese Lösung mit Wasser verdünnt und mit der Schlundsonde eingegossen. Das Tier befand sich wohl, hatte keine dünnen Darmentleerungen. Am 20. ging das Tier leider zugrunde, da die Schlundsonde in die Trachea geraten war.

Die Untersuchung auf Quecksilber verlief an allen Tagen gänzlich negativ.

Versuch 9.

Kaninchen von 2150 g Körpergewicht. Fütterung mit 600 g Mohrrüben, die am 1. und 2. Tage (9. und 10. II.) nicht vollständig gefressen wurden. Am 10. II. erhielt das Kaninchen mit dem Futter 12,8 mg Hg_2Cl_2 gleich 10,8 mg Hg. Am 11. fanden sich leicht diarrhöische Entleerungen, der Harn war jedoch nicht verunreinigt. Am 11., 12. und 13. erhielt das Kaninchen dieselbe Quantität Kalomel, mit 0,4 g Tannalbin gut durchgemischt, mit der Nahrung (ein Teil der abgewogenen Mohrrüben wurde gröblich zerkleinert und mit dem Pulver gut durchgemischt, stets in derselben Reibschale, die inzwischen nicht gereinigt wurde; das Tier fraß diese Mischung zögernd, aber vollständig auf). Das Befinden des

Tieres war gut, keine diarrhöischen Entleerungen. Körpergewicht am 14. II. 2210 g.

Die Untersuchung des Harns auf Quecksilber hatte an allen Tagen ein gänzlich negatives Resultat, das Kalomel scheidet also für die weiteren Schlußfolgerungen überhaupt aus.

Nachfolgende Tabelle enthält eine Übersicht über die mit dem Tannat des paranucleinsauren Quecksilbers angestellten Versuche.

Vers.-Nr.	Angewendete Verbindung	Wieviel Quecksilber in dem Präparat gegeben wurde und in welcher Weise	Quecksilber im Harn	Futter
6a	Tannat des paranuclein-sauren Hg	1 Tag 5,4 mg, dann 3 Tage je 2,7 mg	nachweisbar	Mohrrüben
6b	do.	do.	0	Weißkohl
1	do.	Je 2,7 mg an 5 Tagen	Spur	do.
2	do.	3 Tage je 5,4 mg, 1 Tag 8,1 mg, 1 Tag 10,8 mg	anfangs wenig, später reichlich	do.

Nach dem Ausfall der Versuche 6a und 6b, die an demselben Kaninchen angestellt sind, scheint es, daß die Nahrung auf den Übergang aus Quecksilber in den Harn bei derselben Quantität der verabreichten Verbindung von Einfluß ist, allerdings wurde auch in Versuch 1 bei Weißkohlfütterung nach 5 Tage lang fortgesetzter Verabreichung der Verbindung entsprechend 2,7 mg Hg pro Tag eine Spur von Quecksilber im Harn gefunden.

Vers.-Nr.	Verabreichte Quecksilber-verbindung	Wieviel Hg in dem Präparat gegeben wurde und in welcher Weise	Quecksilber im Harn	Futter
7a	Cholsaures Hg	Je 4,9 mg an 4 Tagen	0	Mohrrüben
7b	do.	Je 9,8 mg an 2 Tagen, anschließend an 7a	nachweisbar	do.
5	do.	Je 9,8 mg an 4 Tagen	do.	Hafer, Kartoffeln, Milch
4	do.	Je 9,8 mg an 4 Tagen	0	Weißkohl
3	do.	Je 9,8 mg an 5 Tagen	zweifelhafte Spur	do.

Diese Versuchsreihe spricht entschieden dafür, daß man, um Nachweisbarkeit von Hg im Harn zu erzielen, bei Fütterung mit Weißkohl mehr von der Verbindung geben muß als bei Fütterung mit Mohrrüben oder einer aus Hafer, Kartoffeln und Milch gemischten Nahrung.

Man konnte zunächst denken, daß die Beschaffenheit des Harns an diesem Unterschied schuld sein könnte, der bei Fütterung mit Weißkohl Thiosulfat enthält, bei Fütterung mit Mohrrüben aber frei davon ist. Nachdem ich aber durch Kontrollversuche mich überzeugt habe, daß die Nachweisbarkeit des Quecksilbers im Weißkohlharn nicht beeinträchtigt ist, ist die nächstliegende Deutung natürlich die, daß die Art der Nahrung die Resorption beeinflußt, daß dieselbe bei Kohlfütterung schlechter ist als bei Mohrrübenfütterung oder einer aus Hafer, Kartoffeln und Milch zusammengesetzten Nahrung. Daß der Grad der Füllung des Darmkanals auf die Resorption zugeführter chemischer Verbindungen von Einfluß ist, weiß man von Versuchen mit heterogenen Substanzen und toxikologischen Versuchen her seit langer Zeit, daß aber auch die Art der Nahrung einen solchen Einfluß ausüben kann, ist meines Wissens bisher nicht bekannt. Es ist zu vermuten, daß dieser Einfluß sich auch bei manchen anderen Substanzen, nicht allein beim Quecksilber, bemerkbar machen wird, indessen läßt sich ohne weitere Versuche hierüber nichts Bestimmtes voraussagen.

Was die Art und Weise betrifft, in der die Weißkohlfütterung die Resorption beeinträchtigt, so kann man vermuten, daß das Quecksilber durch Bildung von Mercaptid und Quecksilbersulfid in größerem oder geringerem Maße der Resorption entzogen wird. (Es würde darin eine allerdings ganz eigenartige Schutzwirkung des Organismus liegen.) Versuche mit Quecksilbermercaptid, die alsbald angestellt werden sollen, werden über die Richtigkeit der Vermutung vielleicht eine Entscheidung geben. Ebenso sollen Versuche über die Einwirkung des Darminhaltes bei Mohrrübenfütterung einerseits, Weißkohlfütterung andererseits auf Quecksilberverbindungen angestellt werden.

Es ist nicht unmöglich, daß auch die Dosis toxica durch die Art der Nahrung bei Kaninchen beeinflußt wird. Ist schon ohne-

hin die Feststellung dieser bei innerlicher Verabreichung giftiger Substanzen recht unsicher gewesen, so wird sie jetzt durch die mitgeteilten Beobachtungen noch unsicherer, indessen möchte ich doch nicht versäumen, darauf hinzuweisen, daß dieser Einfluß sich beim Menschen, meiner Ansicht nach, schwerlich bemerkbar machen wird, da seine Nahrung nicht so einseitig ist. Immerhin wird man gut tun, bei der innerlichen Verabreichung von Quecksilberverbindungen von solchen Nahrungsmitteln abzuraten, von denen es nach den Angaben von Nencki einerseits, den ausführlichen Untersuchungen von Rubner[1]), Niemann, Stagnitta-Balistreri andererseits bekannt ist, daß sie zu Mercaptanausscheidung im Harn führen, wie Spargel, die verschiedenen Kohlarten, Teltower Rüben usw.

Bei Betrachtung der tabellarischen Übersichten ergibt sich außerdem noch eine zweite Schlußfolgerung, nämlich die, daß die Tanninverbindung des paranucleinsauren Quecksilbers leichter resorbiert wird als das cholsaure Quecksilber, auch wenn dieses mit Tannalbin kombiniert wird. Indessen ist diese Tatsache von geringerem Interesse, wenigstens in praktischer Beziehung da man bei der praktischen Anwendung diesen Nachteil des cholsauren Quecksilbers leicht durch eine höhere Dosis der schwerer resorbierbaren Verbindung ausgleichen kann, sofern die Resorption nur überhaupt mit Sicherheit erfolgt. Auf der anderen Seite ist es aber meines Erachtens auch nicht gerechtfertigt, einen Vorzug des cholsauren Quecksilbers darin zu sehen, daß es innerlich in größeren Dosen gegeben werden kann, wie das geschehen ist: man kann daraus nicht etwa auf eine geringere Giftigkeit schließen; ein Urteil hierüber ist überhaupt nur bei löslichen Verbindungen möglich, die man subcutan oder noch sicherer intravenös verabreichen kann.

Ich schließe hieran noch die Mitteilung eines Versuchs, der die Bekömmlichkeit und Resorbierbarkeit der Tanninverbindung des paranucleinsauren Quecksilbers beim Fleischfresser zeigt. Zu dem Versuch diente ein Hund von ca. 18 kg, der mit 450 g Fleisch, 70 g Speck und etwas Reis gefüttert wurde.

Die Quecksilberverbindung wurde mit dem Futter gegeben.

---

[1]) Arch. f. Hygiene **19**, 317, 1893.

Datum	Verfütterte Quantität der Verbindung	Hg mg	Hg im Harn
23. V.	0,17	10,8	Spur
24.	0,17	10,8	nicht untersucht
25.	0,17	10,8	do.
26.	0,17	10,8	schwach positiv
27.	0,17	10,8	nicht untersucht
28.	0,255	16,2	do.
29.	0,340	21,6	stark positiv
30.	0,340	21,6	in der Hälfte des Harns stark positiv

Das Befinden des Tieres war gut, das Futter wurde gut gefressen, der Kot von der gewöhnlichen Beschaffenheit. Die Harnentleerung war reichlich. Der Harn frei von Eiweiß, so oft darauf untersucht wurde.

Zur Kenntnis der Eigenschaften des Phytins.

II. Mitteilung.

Von

M. A. Jegorow.

(Aus dem Landwirtschaftlichen Institut in Petrowskoje-Rasumowskoje, Moskau.)

(Eingegangen am 28. Februar 1914.)

Die Ansichten der verschiedenen Autoren über die Struktur des Phytins variieren ziemlich stark und können gut in drei Gruppen eingeteilt werden.

1. Posternak[1]) ist der Meinung, daß Phytin ein Mg-Ca-Salz der Anhydrooxymethylendiphosphorsäure ist, deren Formel er folgendermaßen schreibt:

$$\begin{array}{l} CH.OH{-}O.P\begin{matrix}\diagup (OH)_2 \\ > O \\ \diagdown (OH)_2\end{matrix} \\ | \\ CH.OH{-}O.P \end{array} \quad \text{oder} \quad O\begin{matrix}\diagup CH\begin{matrix}\diagup H \\ \diagdown O.PO.(OH)_2\end{matrix} \\ \diagdown CH\begin{matrix}\diagup O.PO.(OH)_2 \\ \diagdown H\end{matrix}\end{matrix}$$

Er erklärt die Inositbildung bei der Hydrolyse mit schwachen Säuren durch die Abspaltung des Formaldehyds, das sich dann zu Inosit kondensiert.

In unserer ersten Mitteilung[2]) haben wir gezeigt, daß beim Kochen mit Wasser unter gewöhnlichem Druck Phytin in Inosit und Phosphate sehr leicht zerlegt werden kann. Dieser Umstand hat uns die Möglichkeit gegeben, die Behauptung von Posternak experimentell zu kontrollieren. Der Versuch wurde nach der vorgeschlagenen Methode von E. Winterstein ausgeführt: eine abgewogene Menge Phytin wurde in einem Rundkolben mit 10%iger H_2SO_4 übergossen und einer Wasserdampfdestillation unterworfen, bis sich in der Vorlage ungefähr

[1]) Compt. rend. **137**, 439, 1903.

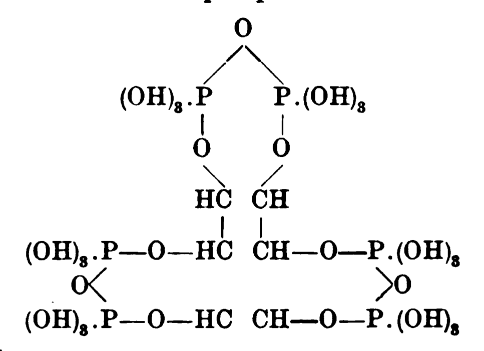
[2]) Diese Zeitschr. **42**, 432, 1912.

$^1/_2$ Liter Flüssigkeit angesammelt hatte. In dem Destillierkolben war eine bedeutende Menge der abgespaltenen Phosphorsäure zu konstatieren, während im Destillat keine Spuren von Formaldehyd zu entdecken waren.

Sowohl aus unseren Versuchen, als auch aus mehreren anderen (Ausführliches siehe in unserer Arbeit „Die Phosphorsäureverbindungen der Pflanzen und ihre Bestimmungsmethoden“[1]), kann man schließen, daß die Behauptungen Posternaks den Tatsachen nicht entsprechen.

2. C. Neuberg[2]) äußert sich auf Grund seiner und der von Suzuki[3]) und seiner Mitarbeiter erhaltenen Resultate über die Wirkung der Phytase auf Phytin gegen die Möglichkeit der Kondensierung im Sinne von Posternak. Die Arbeit von Suzuki haben wir schon früher[4]) besprochen; die Versuchsresultate sind einerseits nicht genügend methodologisch begründet, andererseits erscheint die Reinheit des Präparats zweifelhaft, da eine Verunreinigung durch $BaCl_2$, das die Autoren vor dem Phytasefällen nicht entfernt haben, zu vermuten ist. Neuberg begründete seine Anschauungen durch seine Phytindestillationsversuche, wobei er aus dem Destillat Furfurol isoliert hat, während er bei der Destillation von echten Formaldehydestern kein Furfurol auffinden konnte.

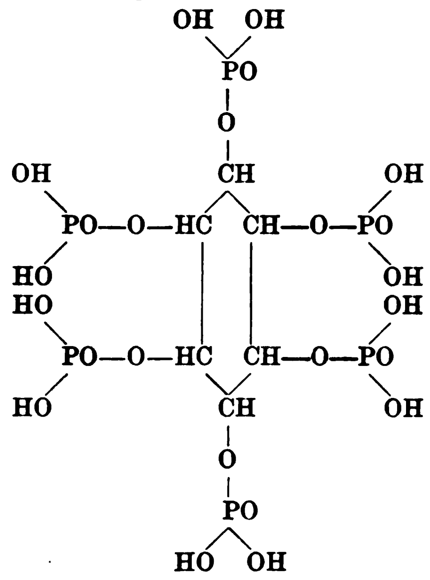
Unter Zugrundelegung des Nachweises von präformiertem Inosit und der Analysenzahlen von Posternak, kommt er zur folgenden Formel für Inositphosphorsäure:



[1]) Annales de l'Institut agronomique de Moscou 5, 1 bis 94, 1913.
[2]) Diese Zeitschr. 5, 443, 1907; 9, 557, 1908.
[3]) The Bull. of the Coll. of Agr. Tokyo 7, Nr. 4, 503, 1907.
[4]) Diese Zeitschr. 42, 432, 1912.

Mit anderen Worten müßte die Synthese dieser Verbindung nach Neuberg unter Abspaltung von 3 Mol. Wasser vor sich gehen.

Eng an diese Formel schließt sich die Formel von Suzuki an, wie es aus dem folgenden Schema ersichtlich ist:



d. h. die Synthese soll unter Abspaltung von 6 Mol. Wasser vor sich gehen. Das Gemeinschaftliche dieser beiden Formeln ist die Beteiligung der Orthophosphorsäure an der Synthese.

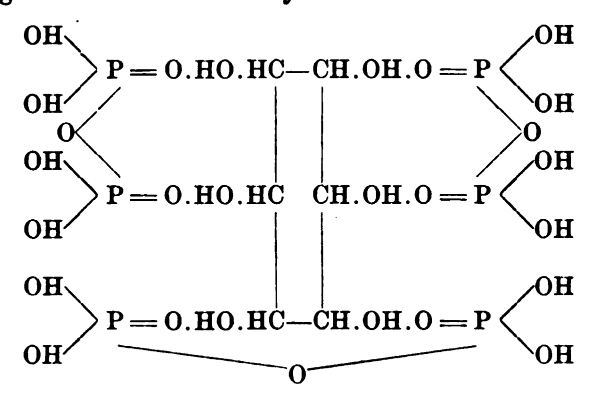
3. Endlich kommt E. Starkenstein[1]) auf Grund seiner Versuche zu der Schlußfolgerung, daß Phytin ein Komplex und kein Ester ist und daß die Synthese der Inositphosphorsäure dermaßen vor sich geht, daß auf jede CHOH-Gruppe 1 Mol. H_3PO_4 kommt, wobei jede 2 Moleküle Phosphorsäure 1 Mol. Wasser abgeben, und daß schließlich ein Inositpyrophosphorsäureester folgender Konstitution

```
                            /OH
  \CH.OH.O = P<—OH
   |                        \
   |                         >O—H2O
   |                        /
  /CH.OH.O = P<—OH
                            \OH
```

entsteht.

[1]) Diese Zeitschr. 30, 56 bis 98, 1910.

Die Annahme des Autors über die Beteiligung der Pyrophosphorsäure an der Synthese basiert auf folgenden Betrachtungen. Für die Fällung der Phosphate ist in erster Linie die Anzahl freier Hydroxyle oder Wasserstoffaffinitäten maßgebend; Molybdänlösung gibt mit Phosphorsäure eine Verbindung von der Zusammensetzung $(NH_4)_3PO_4 + 12\, MoO_3 + 6\, H_2O$. Da jeder Phosphorsäurerest nur 2 Hydroxylgruppen hat, so ist die Bildung des gelben Niederschlages ausgeschlossen, was sich auch für frisch bereitetes Ca-Phytin als richtig erwiesen hat. Unserer Meinung nach sind diese Beweise von Starkenstein, die ihn zur folgenden Formel von Phytinsäure führen:



nicht genügend[1]).

Dies sind die verschiedenen Ansichten über die Struktur des Phytins. Es ist nicht schwer zu sehen, inwiefern sie voneinander differieren; alle Versuche, diese Frage von einer anderen Seite zu erforschen, erscheinen sehr wünschenswert. Man begreift leicht, daß diese Verschiedenheit so lange bestehen wird, bis es gelingt, Phytin auf synthetischem Wege zu erhalten und seine Struktur mit vollkommener Sicherheit festzustellen.

Es sind zahlreiche Versuche angestellt worden, welche die Synthese des Phytins bezweckt haben, doch wie wir uns aus der weiter angeführten Übersicht überzeugen können, sind bis jetzt keine einwandfreien Synthese- oder Reinigungsmethoden des Phytins ausgearbeitet.

---

[1]) S. uns. I. Mitteil.

Soweit unsere Kenntnis reicht, ist Angelo Contardi[1]) der erste gewesen, der die synthetische Gewinnung des Phytins beschrieben hat.

Beim Erwärmen von trockenem Inosit mit Phosphorsäure (spez. Gew. 1,7) in einem CO_2-Strom auf 160 bis 165° beobachtete der Autor, daß schon bei 120° Inosit sich in Phosphorsäure aufzulösen beginnt. Erhitzt man weiter, so scheidet sich bei 140 bis 145° Wasser aus. Nach der Beendigung der Erwärmung, die 8 bis 10 Stunden dauert, reinigt man die Substanz durch nochmaliges Auflösen in 0,2 bis 0,5%igem HCl und Fällen mit $BaCO_3$. Auf diese Weise erhält man das Ba-Salz der Inosithexaphosphorsäure mit 56% Ba und 12,5% P (die Theorie verlangt 55,9% und 12,63%).

Der Verfasser sagt, daß unter solchen Bedingungen die Synthese bis zu Ende geht. Der so gewonnene Ester soll nach Contardi die empirische Zusammensetzung $C_6H_{18}O_{24}P_6$ haben.

Jedoch hat M. P. Carré[2]) beim Wiederholen der Versuche von Contardi gefunden, daß die vom letzteren beschriebenen Verbindungen bloß Gemische der Phosphorsäure und entsprechenden Alkohols, d. h. Inosit und deren Zerfallprodukte sind. Beim Titrieren des Sirups mit Heliantin, Phtalein und Phtalein + 3 Teile $CaCl_2$ beobachtete Carré, daß statt 2 Mol. Alkali, wie es dem Estertypus entsprechen würde, der Sirup von Contardi 3 Mol. Alkali zur Neutralisation verbrauchte.

Wir wollen nicht auf die Erwiderung von Contardi eingehen, da sie zur Aufklärung der Frage nichts beigebracht hat. Bemerkenswert ist nur ein Versuch[3]). Es wurden H_3PO_4 und Hexacetylinosit in einem trockenen Wassertoffstrom auf 133 bis 135° erhitzt, dabei spaltete sich Essigsäure quantitativ ab und es entstand der Inositphosphorsäureester. Wenn diese Beobachtung richtig wäre, so müßte man die Behauptung Starkensteins als unbegründet verwerfen.

Endlich gelang es in allerletzter Zeit R. J. Anderson[4]), einige Verbindungen von Phosphorsäure mit Inosit herzustellen, indem er ein Gemisch derselben im Vakuum auf 140 bis 160°

---

[1]) Chem. Centralbl. 1, 1033, 1910.

[2]) Bull. de la Soc.-Chem. de France 9 bis 10, Serie 4, Nr. 5, 159, 1911.

[3]) Chem. Centralbl. 2, 186, 1912.

[4]) Ibid. 2, 504, 1912.

erwärmte. Leider war es uns unmöglich, die Originalarbeit durchzusehen und die Details zu prüfen.

Das ist alles, was bis jetzt über die uns interessierende Frage veröffentlicht wurde. Es fällt sofort auf, daß alle diese Arbeiten eine gemeinsame schwache Seite haben, sie leiden nämlich an dem Mangel der analytischen Kontrolle. Man kann vermuten (s. oben bei Carré), daß die Synthese keine vollständige ist und daß bis jetzt keine Methode ausgearbeitet wurde, die eine Reinigung des Produktes von den beigemengten Stoffen, Ausgangsmaterialien gestatten würde. Man überzeugt sich leicht, daß das Verfahren von Contardi zur Befreiung des synthetisierten Körpers von den Verunreinigungen, besonders von Phosphorsäure, nicht geeignet ist.

Die unten angeführten Daten bilden die Fortsetzung unserer vorläufigen Untersuchungen sowohl über Phytin, als auch über seine Grundsubstanz — Inosit.

In unserer ersten Mitteilung führten wir die Versuchsresultate einer Trennung des anorganischen P_2O_5 in Form von Na_2HPO_4 und des Phytin-P_2O_5 nach der Methode von Schulze-Castoro an. In dem gegebenen Fall gibt diese Methode ganz genaue Resultate. Dieselbe haben wir in unserer vorläufigen Arbeit benutzt. Gehen wir jetzt zu dem experimentellen Teil über.

Die Versuche haben wir in einem Rundkolben von 100 ccm Inhalt ausgeführt. Das Kölbchen wurde mit einem dreifach (für Thermometer, Ab- und Zuflußrohr) durchbohrten Pfropfen verschlossen. Einen Teil des Inosits haben wir von Merck bezogen, den anderen hat uns Prof. E. Winterstein in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt, und wir erfüllen die angenehme Pflicht, uns bei ihm an dieser Stelle herzlichst zu bedanken. Die Phosphorsäure stellten wir aus dem Kahlbaumschen Präparat vom spez. Gew. 1,7 durch teilweise Sättigung mit Phosphorsäureanhydrid her. Der so erhaltene Körper bestand aus 85,84% H_3PO_4 oder 62,2% P_2O_5 und 14,16% H_2O.

Das Gemisch von dem einige Tage über Schwefelsäure getrockneten Inosit und Phosphorsäure erwärmte man in drei ersten Versuchen 6 bis 8 Stunden auf dem Ölbad auf 160 bis 165° in einem Strom trockenen und gereinigten Stickstoffs. Die entstandene braune und zähe Masse löste man in

0,2 $^0/_0$igem HCl und filtrierte von den ungelösten braunen Flocken ab. In dem Filtrat, das auf ein gewisses Volumen gebracht wurde, bestimmte man den Gesamtgehalt an P_2O_5 (nach vorhergehendem Zerstören mit H_2SO_4 und HNO_3) nach der Molybdänmethode und den Gehalt an dem anorganischen P_2O_5 nach dem Verfahren von Schulze-Castoro. In der folgenden Tabelle sind die Analysenergebnisse in Mittelwerten angeführt.

Versuch	Es wurde genommen			Erhalten nach d. Erwärmung in der Lösung			Organisches P_2O_5 in $^0/_0$ von P_2O_5 in der Lösung
	Inosit g	H_3PO_4 g	P_2O_5 g	Gesamtgehalt an P_2O_5 g	Anorg. P_2O_5 g	Org. P_2O_5 g	
I	1,23	3,90	2,443	1,865	1,317	0,548	29,39
II	3,70	6,43	3,999	4,120	2,064	2,056	49,91
III	3,77	9,31	5,790	6,075	3,600	2,475	40,74

Aus dieser Tabelle ersehen wir, daß das maximale Quantum des organisch gebundenen P_2O_5 die Hälfte, das minimale aber ein Drittel der genommenen Menge beträgt. Dabei kam man auf manche unangenehme Folgen des Arbeitens mit Stickstoff, da es trotz aller Vorsichtsmaßregeln nicht gelang, den Stickstoff von seinen Oxyden zu befreien, und deswegen erhielt man einen in HCl unlöslichen Rest.

Im den nächsten Versuchen unternahmen wir die Erwärmung in einer trockenen Wasserstoffatmosphäre und bei niedrigerer Temperatur.

Versuch 4.

3,29 g trockenen Inosits und 12,03 g Phosphorsäure (8,208 g P_2O_5 enthaltend) wurden in demselben Kölbchen auf dem Wasserbad erhitzt. 10 bis 15 Minuten nach dem Beginn des Erwärmens löste sich der Inosit vollständig auf (vgl. Contardi). Das Reaktionsgemisch wurde 72 Stunden erhitzt; es resultierte eine dicke, zähe, schwach braune Masse, die nach dem Schluß des Versuches, Erkalten und Vertreiben von Wasserstoff durch trockene Luft, 12,90 g wog, folglich betrug der Gesamtverlust während des Versuches 2,42 g; der Wasserverlust der reagierenden Substanzen beträgt 0,71 g, bei der Esterifizierung sind also 1,71 g verloren gegangen. Die so erhaltene Masse löste sich vollständig in 0,2 $^0/_0$igem HCl. Ein Teil der Lösung wurde zur Bestimmung der organisch unbeteiligten

Phosphorsäure verwendet. Die Analyse hat ergeben, daß 4,935 g frei und 3,273 g oder 39,87 % der genommenen Menge organisch gebunden sind.

Aus unseren Versuchen ergeben sich also zwei Folgerungen:

1. Es unterliegt keinem Zweifel, daß Phosphorsäure und Inosit beim Erwärmen ohne Sauerstoffzutritt eine gewisse organische Verbindung geben. Die Synthese derselben konnte aber niemals bis zum Ende geführt werden. Dieser Satz stürzt also die Behauptungen von Contardi und Carré.

2. Die Synthese der organischen P-Verbindung und ihr Zerfall (wie wir das in unserer ersten Mitteilung gezeigt haben) geht bei ziemlich niedriger Temperatur, z. B. auf dem kochenden Wasserbade, vor sich.

Sobald diese Tatsachen festgestellt waren, tauchte die Frage der Reinigung des Schlußproduktes von den Ausgangsmaterialien auf. Das übriggebliebene Produkt, das wir in obigen Versuchen erhalten haben, wurde zur Ausarbeitung einer Entfernungsmethode der freien Phosphorsäure verwendet.

Nach kurzer Zeit konnten wir uns überzeugen, daß das Phosphorsäureabscheidungsverfahren von Contardi absolut nicht ausreicht.

Nach vielen Überlegungen wählten wir eine Methode, die, wie Versuch 5 zeigen wird, ganz befriedigende Resultate gegeben hat.

Versuch 5.

7,39 g Phosphorsäure (5,042 g P_2O_5) wurden mit 2,01 g Inosit in einem Vakuumapparat und in Wasserstoffatmosphäre auf 143° während 6 Stunden gehalten. Die dunkelbraune im durchfallenden Lichte kirschrote Masse löste man in wenig Wasser auf und erwärmte mit Tierkohle bis zur Entfärbung. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbad bis zur Sirupkonsistenz eingedampft und in einem Extraktionsapparat bei Zimmertemperatur mit Äther behandelt. Auf diesem Wege gelang es, die nicht an der Reaktion beteiligte Phosphorsäure zu entfernen und einen dicken strohgelben Sirup zu bekommen. Aus diesem entnahm man mittels eines Capillarröhrchens eine Probe und untersuchte sie nach den Angaben von Schulze-Castoro. Das Resultat war negativ. Um nachzuweisen, daß hier wirklich P_2O_5 vorhanden ist, wurde eine ebensolche Probe genommen

und mit konz. H_2SO_4 und HNO_3 zerstört. Die saure Molybdänlösung gab einen bedeutenden gelben Niederschlag, der sich dann mit Mg-Lösung in eine weiße krystallinische Masse umwandelte. Nachdem wir festgestellt haben, daß das synthetische Produkt keine anorganische Phosphorsäure mehr enthält, gingen wir zur Bestimmung der organisch gebundenen Phosphormenge über, die mittels Zerstörung des erhaltenen Körpers mit konz. H_2SO_4 und HNO_3 geschah. An dieser Stelle führen wir die Versuchsresultate an:

Abgewog. Menge d. vollkom. trock. Subst. g	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5	Dasselbe in %	Mittelwert %	P %
a) 0,2729	0,2256	0,1443	52,98	51,76	22,60
b) 0,2729	0,2160	0,1383	50,64		

Man ersieht leicht, daß die erste Hälfte der Frage, d. h. die Phosphorsäureentfernung, erledigt ist. Die nächsten Untersuchungen werden sich mit der Isolierung des freien Inosits beschäftigen.

Zusammenfassung.

1. Trotz der Behauptungen von Contardi und Carré ist die Synthese der organischen Phosphorverbindung keine vollständige.

2. Wie der Versuch gezeigt hat, geht diese Synthese schon bei ziemlich niedriger Temperatur vor sich.

3. Die sich an der Synthese nicht beteiligende Phosphorsäure ist leicht mit Äther zu entfernen.

4. Der nach dem Auswaschen erhaltene Körper enthält 22,60% organisch gebundenen Phosphor.

5. Es ist die Aufgabe künftiger Untersuchung, die Natur der Verbindung festzustellen und eine Methode zur Entfernung des freien Inosits auszuarbeiten.

Im folgenden gehen wir zur Beschreibung anderer Versuche über, die zum Ziel haben, einige wichtige Phytineigenschaften, die für die Ausarbeitung der Trennungsmethode des organischen P_2O_5 vom P_2O_5 des Phytins von Bedeutung sind, zu erläutern.

1908 schlug Stutzer[1]) eine Änderung der bekannten Schulze-Castoroschen Trennungsmethode[2]) des leichtlöslichen P_2O_5 von der P_2O_5 der anorganischen Phosphate vor. Die Methode von Stutzer besteht in Extrahierung des Materials mit 1⁰/₀iger alkoholischer HCl. Das Phosphat versetzt man mit einer $CaCl_2$-Lösung und fällt mit Ammoniak. Den entstandenen Niederschlag löst man in HNO_3 und analysiert nach dem Molybdänverfahren. E. Schulze[3]) erwiderte aber, daß Phytin gleichfalls in HCl löslich, mit NH_4OH fällbar ist und mit Molybdänlösung einen Niederschlag gibt, und daß man noch experimentell nachweisen muß, ob das Phytin keinen Fehler bei anorganischer P_2O_5-Bestimmung nach Stutzer verursacht. In unserer I. Mitteilung[4]) konnten wir beweisen, daß in bezug auf saure Molybdänlösung Phytin sich genau wie die anorganischen Phosphate verhält: ein bedeutender Teil des Phytin P_2O_5 gibt den charakteristischen gelben Niederschlag, der sich der Magnesiumlösung gegenüber ebenso wie Phosphate verhält. Die Ursache dieser Erscheinung blieb für uns bis zuletzt rätselhaft, weil manche Autoren behaupteten, daß Phytin sehr beständig ist. Betrachten wir diese Tatsachen und unsere eigenen Spezialversuche (siehe I. Mitteilung), so müssen wir jedoch annehmen[5]), daß es „in dem organischen Phosphorkomplex Gruppen gibt, die mit dem sauren Ammoniummolybdat reagieren können" und daß „eine Untersuchung der so erhaltenen Niederschläge noch durchzuführen ist".

Das Nachfolgende ist nun eine Fortsetzung und Entwickelung unserer früheren Untersuchungen über die Phytineigenschaften.

Nachdem wir nachgewiesen haben, daß Phytin beim Erwärmen mit Wasser unter gewöhnlichen Bedingungen in seine Komponenten zerlegbar ist, konnten wir a priori vermuten, daß der Phytinspaltungsprozeß schon bei Zimmertemperatur vor sich geht; es ist aber augenscheinlich, daß er dann viel langsamer verlaufen muß. Einen entsprechenden Versuch haben

---

[1]) Diese Zeitschr. 7, 471, 1908.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 455.

[3]) Vers.-Stat. 73, 35 u. 85, 1910.

[4]) Diese Zeitschr. 42, 432, 1912.

[5]) Annales de l'Inst. agronom. de Moscou 5, 71, 1913.

wir am 26. I. 1913 angestellt. Vier Glasröhrchen von ungefähr 12 ccm Inhalt wurden mit je 0,21 g Phytin und 10 ccm H_2O gefüllt. Zwei von ihnen wurden ausgepumpt und zugeschmolzen, die zwei anderen wurden mit je 5 Tropfen Chloroform versetzt und zugeschmolzen. Nach diesen Operationen stellte man die Röhrchen auf ein auf der Südseite befindliches Fenster und schüttelte sie von Zeit zu Zeit. Während des ganzen Versuches blieb ein Teil des Phytins ungelöst.

Am 26. IX., also 8 Monate später, öffnete man zwei Röhrchen, das eine mit $CHCl_3$, das andere ohne $CHCl_3$. In dem ersten konstatierte man nach dem Geruch die Anwesenheit von Antisepticum. In beiden Röhrchen beobachtete man die ungelöste Substanz, über der sich eine vollkommen klare Flüssigkeitsschicht befand. In dem abfiltrierten Teil wurde nach der Methode von Schulze-Castoro das anorganische P_2O_5 in beiden Röhrchen qualitativ nachgewiesen. Hier wurde also P_2O_5-Abspaltung beobachtet.

Von diesen Versuchsergebnissen ausgehend hielten wir es für möglich, in dieser Richtung etwas weiterzukommen und wollten in erster Linie das rätselhafte Verhalten des Phytins dem sauren Ammoniummolybdat gegenüber aufzuklären versuchen.

Zu diesem Zwecke lösten wir ca. 2 g Phytin in verdünnter HNO_3 und versetzten die Flüssigkeit mit saurer Molybdänlösung. Das Gläschen wurde auf einem speziell eingerichteten Wasserbad 4 Stunden bei 40 bis 50° gehalten. Darauf filtrierte man den sich in großer Menge abgeschiedenen charakteristischen gelben Niederschlag ab und brachte das Filtrat wiederum aufs Wasserbad; der Niederschlag wurde gewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen.

Gläschen + Filter + Niederschlag .	20,2505 g
Leeres Gläschen	16,7054 g
Niederschlag + Filter	3,5451 g
Filter allein	0,3339 g
Niederschlag	3,2112 g

Den Niederschlag löste man in $^n/_{10}$-KOH und titrierte den Alkaliüberschuß mit $^n/_{10}$-H_2SO_4 zurück. Es hat sich erwiesen, daß die Menge des P_2O_5 3,65% oder 0,1171 g des gelben Niederschlags ausmacht. Es ist bekannt, daß einige Koeffizien-

ten zur Berechnung des P_2O_5 in dem gelben Niederschlag nach dem Gewicht des letzteren vorgeschlagen worden sind. Wir haben folgende drei benutzt: 0,035, 0,038, 0,0438. Für den gegebenen Versuch beträgt die Menge des mit Hilfe dieser Zahlen bestimmten P_2O_5 0,1124, 0,1220 und 0,1406 g oder 3,5%, 3,8% und 4,38%. Die dritte Größe nun zeigt einen bedeutenden Unterschied von den durch das Titrieren des Niederschlages erhaltenen Zahlen, die zwei ersteren gaben ganz gleiche Resultate.

Schon nach diesem ersten Versuch konnten wir vermuten, daß ein bedeutender Teil des P_2O_5 im gelben Niederschlag dem anorganischen, wahrscheinlich abgespaltenen P_2O_5 zukommt. Die zwei anderen Versuche, die wir mit allmählich absetzenden Niederschlägen aus derselben Phytinmenge wie in dem Versuch 5 angestellt haben, zeigten vollkommen gleiche Resultate:

	Versuch 2	Versuch 3
Gelber Niederschlag	1,2174	0,9908
P_2O_5 in Gramm nach d. Koeffiz.	0,0426—0,0463—0,0533	0,0347—0,0376—0,0434
Dasselbe in % d. Niederschlags	3,50—3,80—4,38	3,50—3,80 —4,38
P_2O_5 in Gramm nach d. Titrieren	0,0448	0,0368
Dasselbe in % d. Niederschlags	3,68	3,71

Diese Versuche beweisen, daß ein bedeutendes Quantum des P_2O_5 im gelben Niederschlag dem anorganischen P_2O_5 zukommt. Da aber die Methode, nach der man dieses festgestellt hat, nicht fein genug ist, so erschien es noch zweifelhaft, ob wirklich kein organisches P_2O_5 zugegen ist. Wenn es aber tatsächlich so wäre, so könnte man auch niemals die Molybdänmethode zur Bestimmung des abgespaltenen, oder sich abspaltenden P_2O_5 anwenden.

Die Lösung dieser Frage bietet keine Schwierigkeit und wir wählten für unsere Versuche zwei Wege. Erstens unterwarfen wir den gelben Niederschlag einer Verbrennung und fingen die entweichende CO_2 in einem Kaliapparat auf. Der zweite Weg bestand darin, daß wir, nachdem einige Portionen des gelben Niederschlags erhalten und sein Gewicht in trockenem Zustand festgestellt, eine Probe in NH_4OH lösten und mit Mg-Mischung fällten; eine andere Probe oxydierten wir zuerst mit konz. H_2SO_4 und HNO_3 und fällten ebenfalls das P_2O_5

mit Mg-Mischung. Bei den zwei ersten Versuchen konnten wir die Anwesenheit des abgespaltenen Inosits nicht annehmen, da es beim Auswaschen des Niederschlags entfernt wurde.

Die Versuche ergaben:

	Versuch 1	Versuch 2
Trockener gelber Niederschlag . . .	0,5497 g	0,6497 g
Gewichtszunahme am Kaliapparat . .	0,0080 g	0,0096 g
In % des Niederschlags	1,455 %	1,478 %

Das bei der Analyse ausgeschiedene Wasser reagiert neutral. Diese zwei gut übereinstimmenden Versuchsergebnisse sprechen für die Möglichkeit der Anwesenheit eines organischen Komplexes in dem gelben Niederschlag.

Die in etwas anderer Weise ausgeführten Versuche ergaben:

	Versuch			
	1	2	3	4
Trockener gelber Niederschlag	0,60080 g	1,25770 g	0,68130 g	0,83270 g
Entsprechende Menge $Mg_2P_2O_7$	0,03440 g	0,07200 g	0,04060 g	0,04900 g
Das darin enthaltende P_2O_5 .	0,02201 g	0,04606 g	0,02597 g	0,03134 g
Dasselbe in %	3,663	3,661	3,819	3,759
Mittel	3,662 %		3,789 %	

Da die Unterschiede zwischen den Versuchen 1 und 2 (ohne Verbrennung des Molybdänniederschlags) und 3 und 4 (mit Verbrennung) unbedeutend sind und in den Grenzen des Versuchsfehlers liegen, so können sie kaum zu einem Schluß führen. Aber wenn man einerseits die Versuchsergebnisse in bezug auf die C-Bestimmung in gelbem Niederschlag, andererseits die gut übereinstimmenden Parallelanalysen des P_2O_5 betrachtet, so kann man, denke ich, vermuten, daß diese Ergebnisse für die Anwesenheit eines organischen Komplexes im Molybdänniederschlag sprechen, da nach dem Verbrennen der letzteren (vgl. Vers. 3 und 4) die Menge des P_2O_5 etwas zunahm.

Die oben beschriebenen Versuche führen uns zu folgenden Schlußfolgerungen:

1. Beim langen Stehen des Phytins mit Wasser unter aseptischen Bedingungen spaltet sich P_2O_5 ab.

2. Durch die saure Molybdänlösung wird das P_2O_5 vom Phytin abgespalten.

3. In dem Molybdänniederschlag ist (unseren Versuchen nach) augenscheinlich eine kleine Menge des organischen Phosphorkomplexes zugegen.

Diese Annahmen, die in einem scheinbaren Widerspruch mit unseren früheren Versuchsergebnissen stehen (s. darüber die oben zitierte russische Arbeit), erklären sich durch den Unterschied zwischen den Säureeinwirkungsperioden: in unseren ersten Versuchen überstieg diese Periode niemals $^1/_2$ Stunde, wenngleich bei 100°, doch waren die Resultate immer negativ.

In letzterer Zeit unternahmen wir noch einen anderen Versuch: ca. 1 g Phytin wurde mit 25 ccm 37,8 $^0/_0$iger HNO_3 übergossen und auf dem Wasserbade bei 40° gehalten. Zur P_2O_5-Bestimmung wurde die Methode von Schulze-Castoro benutzt.

Resultate.

1. Nach 5 Stunden negativ sowohl im Niederschlag als auch im Filtrat.

2. Nach 24 Stunden negativ im Niederschlag, positiv im Filtrat.

3. Nach 72 Stunden positiv sowohl im Filtrat als auch im Niederschlag.

Die Menge des krystallinischen Niederschlags im Vergleich zu der angewandten Phytinmenge war nicht bedeutend. Dieser letztere Umstand ist dadurch leicht erklärlich, daß in Anwesenheit von Ammoniummolybdat die Wirkung der HNO_3 energischer sein muß, da das abgespaltene P_2O_5 sofort ausfällt. An dieser Stelle bemerken wir noch, daß der bei diesen Versuchen erhaltene krystallinische Niederschlag jedesmal beim Nachwaschen mit saurer Molybdänlösung kontrolliert wurde.

Die Versuche werden noch fortgesetzt.

Über Herkunft und Art des mit verdünnter Essigsäure fällbaren Eiweißkörpers der Exsudate.

Von

K. Ujihara (Tokio).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des Kgl. Pathologischen Institutes der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 3. März 1914.)

Inhaltsverzeichnis.

I. Einleitung.

Es ist seit langem eine von vielen Autoren anerkannte Tatsache, daß die entzündlichen Ergüsse einen durch Essigsäure fällbaren Eiweißkörper enthalten, und daß durch den

Nachweis desselben Trans- und Exsudate differenziert werden können, insofern er charakteristisch für Exsudate ist.

Javel[1]) und einige andere Autoren[2]) behaupteten, daß dieser Eiweißkörper keine pathogenetische Beziehung zur Entstehung des Exsudates hat. Jedoch wurde diese Tatsache neuerdings ganz klar durch die Arbeiten von Engländer[3]), Hopper und Zack[4]), Pieper[5]) und Ujihara[6]) festgestellt. Danach ist dieser Eiweißkörper von der Quantität des Eiweißgehalts der Ergüsse abhängig.

Auch findet sich seit geraumer Zeit von den Autoren die Tatsache bestätigt, daß dieser Körper im Hautblaseninhalt und im Harn bei gewissen Nephritiden vorkommt. Doch ist der experimentelle Nachweis über die wichtige Frage, ob er auch bei der Entzündung des Digestionstraktus und der anderen Organe zutage tritt, und wo seine Bildungsstätte zu suchen ist, noch nicht geführt worden.

II. Der experimentelle Nachweis dieses Körpers bei Krankheitszuständen.

Um diesen Eiweißkörper experimentell nachzuweisen, habe ich mich zunächst mit den künstlichen Trans- und Exsudaten der serösen Häute beschäftigt.

1. In serösen Ergüssen.

Da Pleura und Peritoneum entwicklungsgeschichtlich gleichen Ursprung haben, habe ich mich damit begnügt, nur die künstlichen Trans- und Exsudate der Bauchhöhle zu untersuchen.

---

[1]) Javel, Sur la réaction de Rivalta. Compt. rend. Soc. Biol. **1912**, 649 bis 651.

[2]) Patein und Weitz, Contribution de Rivalta des Matières albuminoides du liquide d'ascite. Journ. de pharm. et de chim. **5**, H. 11/12, 1912.

[3]) Engländer, Die Essigsäureprobe zur Unterscheidung der Exsudate und Transsudate. Wiener med. Wochenschr. **1910**, Nr. 10.

[4]) Hopper und Zack, Über die klinische Bedeutung des Essigsäurekörpernachweises in seröser Flüssigkeit. Wiener klin. Wochenschr. **1910**, Nr. 21.

[5]) Pieper, Die Essigsäureprobe zur Unterscheidung der Exsudate und Transsudate. Münch. med. Wochenschr. **1910**, Nr. 1.

[6]) Ujihara, Beitrag zur Kenntnis der durch Essigsäure fällbaren Eiweißsubstanz in serösem Erguß, nebst ihrem klinischen Wert. Berl. klin. Wochenschr. **1914** (bald erscheinend).

a) Experimentelles Transsudat.

Kräftig entwickelten Kaninchen habe ich täglich einmal je 100 ccm Wasser mit der Schlundsonde eingegeben. Dann injizierte ich eine 1 %ige Urannitratlösung subcutan in der in der Tabelle angegebenen Weise. Nach einiger Zeit tritt stets Nephritis auf. Ich habe dann die Bauchhöhle geöffnet, den Ascites gesammelt und genau untersucht.

Versuchs-Tag	Täglich eingegebene Wassermenge ccm	1 %ige Urannitratlösung ccm	Eiweiß im Harn	Bemerkungen
1	100,0	—	—	
2	100,0	1,0 subcutan	—	
3	100,0	—	Spur +	
4	100,0	1,0 subcutan	+	
5	100,0	—	++	
6	100,0	—	++	
7	100,0	1,0 subcutan	++	
8	100,0	—	++	Bauchhöhle geöffnet

Untersuchungsverfahren.

1. Durch Zentrifugieren und Filtrieren entfernte ich zunächst alle Formelemente.

2. Der Gesamteiweißgehalt wurde durch die Kjeldahlsche N-Bestimmungsmethode festgestellt.

Der Eiweißquotient wurde gewonnen, indem vom Gesamteiweißgehalt der Gesamtglobulingehalt abgezogen und die gefundene Zahl durch die Zahl des Gesamtglobulingehalts dividiert wurde.

3. Die quantitative Bestimmung des Gesamtglobulingehalts:

Eine Ergußmenge wurde drei- bis fünffach verdünnt [nach Wiener[1])], mit Magnesiumsulfat (30°) gesättigt, und diese Lösung wurde 24 Stunden lang stehen gelassen. Sie wurde nun mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung befeuchtetem Filterpapier abfiltriert und der Niederschlag wurde mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung so lange gewaschen, bis in dem Filtrat keine Eiweiß-

[1]) Wiener, Über quantitative Globulinbestimmung mittels Ammonsulfatfällung und über die Reindarreichung von Globulinen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 74, 1911.

reaktion mehr zutage trat. Dann wurde das Ganze getrocknet und die Kjeldahlsche Stickstoffbestimmungsmethode angewandt.

4. Der Nachweis des mit Essigsäure fällbaren Eiweißkörpers gelang unter Zuhilfenahme der Rivaltaschen Reaktion. Die zu untersuchende Flüssigkeit muß aber unbedingt klar sein, weil getrübte Flüssigkeiten, selbst wenn keine Eiweißreaktion eintritt, eine solche vortäuschen können, z. B. 0,1 Lecithin in 2,0 ccm Methylalkohol gelöst, dann 10,0 ccm destilliertes Wasser zugefügt und geschüttelt, läßt die Rivaltasche Reaktion vortäuschen.

5. Bei der fraktionierten Fällung mit gesättigter Ammonsulfatlösung hielt ich die mittlere Fällungsgrenze der Globuline ein, nämlich:

Pseudoglobulin (mit „P.“ bezeichnet) 41 %	Euglobulin (mit „E.“ bezeichnet) 31 %
Fibrinoglobulin (mit „F.“ bezeichnet) 26 %	Nucleoalbumin [nach Matsumoto[1])] (mit „N.“ bezeichnet) 15 %

Mit oben genannten Vol.-Proz. gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung wurden die Globuline ausgefällt.

Der Fällungsgrad wird nach 24 Stunden geprüft.

Die mit obiger Untersuchungsmethode gewonnenen Resultate sind in nachstehender Tabelle angegeben.

Tabelle des Versuchs 1.

Versuchstiere	Lebenstage nach Eiweißnachweis im Harn	Beschaffenheit des Ascites	Ascitesmenge ccm	Gesamteiweißgehalt %	Gesamtglobulingehalt %	Eiweißquotient	Rivaltasche Reaktion	Fraktionierte Fällung P.	E.	F.	N.
Kaninchen 1	6	Blaßgelblich, klar, nach einigen Minuten Fibringerinnsel ausgeschieden	ca. 8,0	3,0690 (N) 0,490	1,088 (N) 0,174	1,821	—	+	+	—	—
Kaninchen 2	7	do.	ca. 15,0	3,325 (N) 0,532	1,225 (N) 0,196	1,714	—	++	+ Spur	—	—
Kaninchen 3	7	do.	ca. 20,0	3,238 (N) 0,518	1,313 (N) 0,210	1,467	—	++	+	—	—

[1]) Matsumoto, Über die durch Essigsäure ausfällbare Eiweißsubstanz in pathologischen Harnen. Arch. f. klin. Med. 75, 1903.

In der Tabelle sind vier Stellen hinter dem Komma auf drei reduziert, wenn die betreffende Zahl über 5 war.

Früher teilte ich über die Einteilung und die Fällbarkeit der Globuline durch $(NH_4)_2SO_4$ die Anschauung Hofmeisters. Nach genauer Forschung scheint mir jedoch die Meinung Freunds und Joachims[1]) richtig zu sein. Näheres darüber soll jedoch hier nicht mitgeteilt werden.

In den in obiger Tabelle angegebenen drei künstlichen Ascitesproben ist der Gesamteiweißgehalt ziemlich groß, doch ist eine mit Essigsäure fällbare Eiweißsubstanz nicht zu konstatieren gewesen.

Bei der fraktionierten Fällung ergab sich eine deutliche P-Fraktion und eine geringe E-Fraktion, eine F-Fraktion war nicht zu konstatieren gewesen.

Eiweißquotient: 1,476 bis 1,822.

b) Experimentelles Exsudat.

Um entzündliche Ergüsse in die Bauchhöhle zu erzielen, wurde eine 10%ige Aleuronataufschwemmung in Wasser intraperitoneal injiziert. Nach einiger Zeit wurde die Bauchhöhle geöffnet und der Erguß gesammelt. Das Untersuchungsverfahren entspricht genau dem des ersten Versuchs.

Die Peritonealhöhle der Kaninchen enthielt eine zu geringe Exsudatmenge, als daß mit dieser eine Untersuchung hätte angestellt werden können. Ich spülte daher die Bauchhöhle mit physiologischer Kochsalzlösung aus und untersuchte das Spülwasser dann.

Die Tabelle (s. S. 60) zeigt, daß

1. in entzündlichen Ergüssen mit Essigsäure fällbare Eiweißkörper nachgewiesen werden können;

2. der Eiweißgehalt bei Ergüssen bei Meerschweinchen fast das Doppelte des Eiweißgehaltes des Blutserums beträgt;

3. der Eiweißquotient sich bedeutend vermindert hat;

4. bei der fraktionierten Fällung in Exsudaten die F-Fraktion immer ein positives Resultat ergab;

5. der größere Gesamteiweißgehalt bei Transsudaten nicht unbedingt ein Vorkommen der essigsäurefällbaren Eiweißsub-

---

[1]) Freund und Joachim, Über Serumglobulin. Centralbl. f. Physiol. 16, 1902.

Tabelle des Versuchs 2.

Versuchstiere	Injiziertes Mittel und Dosis	Zeitraum nach erster Injektion Std.	Beschaffenheit der Ergüsse	Menge der Ergüsse	Gesamt-Eiweißgehalt %	Gesamt-Globulingehalt %	Eiweißquotient	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung			
									P.	E.	F.	N.
Meerschweinchen	10%ige Aleuronataufschwemmung 3,0 ccm	24	Klar, blaßgelbl., mäßige Fibringerinnsel ausgesch.	ca. 5,0 ccm	10,500 (N) 1,680	6,125 (N) 0,980	0,714	++	++	+	+	−
Kaninchen I (2300 g)	10%ige Aleuronataufschwemmung 10,0 ccm, täglich 1 mal (2 mal injiz.)	48	do.	gering	1,225 (N) 0,196	0,788 (N) 0,126	0,555	+	++	+	+ gering	−
Kaninchen II (2000 g)	Aleuronataufschwemmung wie Kaninchen I, daneben Pneumokokkenbouillonkultur 1,0 ccm, 24 Std. danach Bauch eröffnet	96	do.	gering	0,788 (N) 0,126	0,428 (N) 0,790	0,799	++	++	++	+	+

stanz voraussetzt. Es scheint, daß zwischen F-Fraktion und dieser Eiweißsubstanz gewisse Relationen bestehen.

2. Mageninhalt und reiner Magensaft.

Bei einem kräftigen Hunde wurde eine Magenfistel angelegt. Nach Heilung der Wunde wurde nachstehend angegebene Untersuchung nach demselben Verfahren wie oben gemacht. In einem anderen Falle wurde der reine Magensaft eines Pawlowschen Blindsackhundes untersucht. Durch die im Magensaft befindlichen Fermente werden die Eiweißsubstanzen indes immer abgebaut; da es ein Fehler wäre, den Eiweißgehalt aus dem Stickstoffgehalt umzurechnen, habe ich statt des Eiweißquotienten den Stickstoffquotienten angegeben.

a) Normaler Mageninhalt und reiner Magensaft.

Der nüchterne Magen der Versuchstiere wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Nach Entnahme des Spül-

wassers wurde die aus der Fistel fließende Flüssigkeit 2 Stunden lang aufgefangen und darauf untersucht. In der Zwischenzeit zwischen den einzelnen Untersuchungen erhielt das Tier als Futter täglich 1 Pfund Rindfleisch. Die Versuche wurden alle 2 Tage vorgenommen. Ich will zunächst vorwegnehmen, daß der frisch aufgefangene reine Magensaft eines Pawlowschen Blindsackhundes keinen in verdünnter Essigsäure fällbaren Eiweißkörper aufweist.

Tabelle des Versuchs 3.

Vers.-Nr.	Beschaffenheit des Magensaftes	Gesamt-N-Gehalt %	Gesamt-Globulin-N-Gehalt %	N-Quotient %	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung				Bemerkung
						P.	E.	F.	N.	
1	Etwas opalescierend, geringer Schleim	0,364	0,154	1,364	—	+ gering	—	—	—	Reaktion ziemlich stark sauer (1–4)
2	do.	0,336	0,126	1,665	—	do.	—	—	—	
3	do.	0,336	1,112	2,000	—	do.	—	—	—	
4	do.	0,308	—	—	—	do.	+ gering	—	—	
5	do.	0,280	0,112	1,500	—	do.	—	—	—	
6	Ohne Schleim	0,140	0,042	2,333	—	do.	—	—	—	Ein nach Aminosäure-Injektion (aus Spinat) vermehrter Magensaft.

Resultat.

Im normalen Mageninhalt der Magenfisteltiere war der Befund für mit Essigsäure fällbare Eiweißkörper sowie bezüglich der F-Fraktion ebenfalls ganz negativ.

Der N-Quotient betrug 1,362 bis 2,333.

b) Im normalen Mageninhalt nach Fütterung mit Rindfleisch.

Fütterung und Untersuchungsverfahren ganz wie oben. Zuerst wurde der nüchterne Hundemagen von der Fistel aus mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurde das Tier mit 100 g gekochtem und gehacktem Rindfleisch, das mit 100 ccm Wasser vermengt war, gefüttert. Nach 1 Stunde wurde von der Fistel aus der Mageninhalt herausgenommen. Dieser wurde koliert, neutralisiert, zentrifugiert und filtriert. Die Untersuchung der vollständig klaren Flüssigkeit ergab folgende Resultate:

Tabelle des Versuchs 4.

Versuchs-Nr.	Verdauungszeit Std.	Beschaffenheit des Mageninhalts	Gesamt-N-Gehalt %	Gesamt-Globulin-N-Gehalt %	N-Quotient	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung P.	E.	F.	N.	
1	1	Gegebenes Fleisch fast alles nicht verdaut; Magensaft nicht reichlich	0,280	0,112	1,500	—	++	+ Spur	—	—	Fleisch ungenügend gekocht.
2	1	do.	0,252	0,098	1,571	—	+	—	—	—	
3	1	do.	0,280	0,101	1,782	—	+	—	—	—	
4	1	do.	0,168	0,078	1,154	—	+	+ Spur	—	—	Fleisch ganz gut gekocht.
5	1	do.	0,126	0,042	2,000	—	+ gering	+ Spur	—	—	

c) Magentranssudat.

(Fütterung und Untersuchungsverfahren wie oben.)

Um eine Magentranssudation hervorzurufen, wurde Kochsalz in steigenden Dosen dem Futter, 100 g gehacktem gekochtem Rindfleisch mit 100 ccm Wasser, beigemengt. Nach 1 Stunde wurde der Mageninhalt herausgenommen und untersucht.

Tabelle des Versuchs 5.

Versuchs-Nr.	Futter	Verdauungsdauer Std.	Beschaffenheit des Magensaftes	Gesamt-N-Gehalt %	Gesamt-Globulin-N-Gehalt %	N-Quotient	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung P.	E.	F.	N.
1	Fleisch 100 g Wasser 100 ccm Kochsalz 10 g	1	Magensaft deutlich vermehrt. Reaktion schwach sauer.	0,336	0,140	1,400	—	+	+ Trübung	—	—
2	Fleisch 100 g Wasser 100 ccm Kochsalz 20 g	1	Reaktion schwach alkalisch.	0,476	0,196	1,428	—	+	—	—	—
3	Fleisch 100 g Wasser 100 ccm Kochsalz 30 g	1	Magensaft stark vermehrt. Schleim gering. Reaktion alkalisch.	0,336	0,134	1,507	—	+	+ Spur	—	—

Obgleich dieselbe Fütterung wie bei Versuch 4 vorgenommen wurde, wurde eine bedeutend reichlichere Menge Flüssigkeit erhalten, was der Transsudation zuzuschreiben ist. Der Stick-

stoffgehalt bot eine Zunahme, aber der N-Quotient, die Globulinfraktion usw. stimmten mit den entsprechenden Resultaten des 4. Versuchs fast überein.

d) Das Exsudat des Magens.

Um eine Magenentzündung hervorzurufen, wurde Jodkali mit dem Futter vermischt bzw. nur einfach Jodtinktur in Wasser verabreicht.

Tabelle des Versuchs 6.

Versuchs-Nr.	Fütterung	Dauer der Verdauung	Beschaffenheit des Magensaftes	Gesamt N-Gehalt %	Gesamt-globulin N-Gehalt %	N-Quotient	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung			
								P.	E.	F.	N.
1	Fleisch 100 g Wasser 100 ccm Kalijod 2 g	1 Stunde	Klar, Menge gering, Reaktion schwach sauer.	0,364	0,210	0,733	+	+	+	+ wenig	–
2	Fleisch 100 g Wasser 100 ccm Kalijod 4 g	1 Stunde	do.	0,420	0,238	0,764	+	++	+ wenig	Trübung +	–
3	Jodtinktur 2 g Wasser 200 ccm	Nach $^1/_4$ Stunde wurde Jodtinktur aus Fistel entnommen, danach Magensaft gesammelt.	do.	0,252	0,084	2,00	–	++	+ wenig	–	–
4	Jodtinktur 5 g Wasser 100 ccm	Gleich wie Versuch 3.	Etwas opalisiert.	0,336	0,224	0,500	++	+	+	+	–
5	2 Tage nach Versuch 4 in Nüchternzeit	Magensaft 1 Stunde lang aus Fistel gesammelt.	Etwas opalisiert, Reaktion sauer.	0,420	0,154	1,728	–	+	+ Trübung	–	–
6	3 Tage nach Versuch 4 in Nüchternzeit	Gleich wie Versuch 5.	do.	0,210	0,056	2,750	–	+	+ Trübung	–	–

Aus obiger Tabelle ist ersichtlich, daß bei den Versuchen 1, 2 und 4 die N-Quotienten sich sehr verringert haben und die F-Fraktion und die Rivaltasche Probe positiv waren, d. h. eine mit Essigsäure fällbare Eiweißsubstanz vorhanden war.

Da bei Versuch 3 die Jodtinkturmenge zu gering gewesen sein dürfte, um einen Magenreiz hervorzurufen, und da bei den Versuchen 5 und 6 die bei Versuch 4 erzielten Magenreize bereits vorübergegangen sein dürften, hatte der N-Quotient

deutlich zugenommen und die Rivaltasche Reaktion, sowie die F-Fraktion waren negativ.

Obige 4 Magenexperimente ergeben, daß im normalen Magensaft sowie im Magentranssudat mit Essigsäure fällbare Eiweißkörper vollständig fehlen und der N-Quotient immer 1 überschreitet, wogegen bei Magenexsudaten der N-Quotient unter 1 sinkt und der essigsäurefällbare Eiweißkörper stets nachgewiesen werden kann. Diese Tatsachen stimmen mit den bei der Beobachtung seröser Ergüsse gewonnenen überein.

3. Darminhalt und reiner Darmsaft.

Die Möglichkeit, daß durch bakterielle, fermentative, chemische Vorgänge usf. die Eiweißsubstanzen im Darm häufiger beeinträchtigt werden als im Magen, ist vorhanden, dazu können diese Eiweißstoffe durch die im Darmkanal verweilenden Nahrungsreste sowie Zersetzungsprodukte verunreinigt werden. Überdies ist es sehr schwer, am Orte der Darmentzündung entstehende Eiweißkörper als solche zu gewinnen.

Um reinen Darmsaft zu gewinnen, wurde bei einem Hunde die sogenannte Thiry-Vellasche Operation vorgenommen, d. h. eine ca. $^1/_3$ m lange Dünndarmschlinge ausgeschaltet. Nach vollzogener Heilung sammelte ich reinen Darmsaft aus dieser Fistel. Bei andern, normalen Hunden benutzte ich, um eine Darmtranssudation hervorzurufen, das Salinische Abführungsmittel; zur Herbeiführung einer Darmexsudation verabreichte ich jedoch eine große Dose Kalomel und untersuchte darauf den entleerten Kot.

a) Normaler Darmsaft (Versuch an Fistelhunden).

Ich entnahm täglich einmal nach der Fütterung Darmsaft aus der Fistel, die vom Darmsaft befeuchtet und von Eiterkokken infiziert war; diese Verunreinigung war während einmonatiger Beobachtung stets in größerem oder geringerem Grade vorhanden, was die Gewinnung reinen Darmsafts erschwerte.

Bei den Versuchen 4 und 5 enthielt der zentrifugierte Bodensatz sehr geringe Mengen von Eiterzellen, weswegen man diesen Darmsaft wohl als reinen Darmsaft behandeln konnte. Der innerhalb 4 Stunden gesammelte Darmsaft betrug nur

ca. 5 ccm. Nach Thiry[1]) ist im reinen Darmsaft nur 8,01 ‰ Eiweiß enthalten, dessen Menge mit der Dauer der Absonderung abnehmen soll. In dem von mir untersuchten Fall zeigt der Eiweißgehalt indes eine ziemlich große Differenz, und stimmt fast mit dem von Pregl[2]) konstatierten überein. In den Versuchen 4 und 5 sind die Resultate der Rivaltaschen Reaktion nur angedeutet. Da indes die F-Fraktion fehlt, darf wohl angenommen werden, daß im reinen Darmsaft eine mit Essigsäure fällbare Eiweißsubstanz fehlt.

Tabelle des Versuchs 7.

Versuchs-Nr.	Zeitraum nach der Operation	Beschaffenheit des Darmsaftes	Gesamt N-Gehalt %	Gesamt-globulin N-Gehalt %	N-Qoutient	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung			
							P.	E.	F.	N.
1	10 Tage	Eiter und Wundsekret beigemengt, leicht chylös.	1,232	0,728	0,692	++	+	+	+ wenig	+
2	16 Tage	Etwas opalisiert, Eiterzellen wenig.	0,448	0,266	0,684	+	+	+	+ Trübung	–
3	20 Tage	do.	0,560	0,308	0,818	+	+	+	+ wenig	–
4	22 Tage	Blaßgelblich, fast klar wie Blutserum.	0,322	0,154	1,091	±	+	+ wenig	–	–
5	24 Tage	do.	0,364	0,168	1,171	±	+	+ wenig	–	–

b) Darminhalt bei Transsudation der Darmwand.

Wenn auch Buchhein und Matthew-Hay[3]) bewiesen, daß die auf Eingabe salinischer Laxantien entleerte Flüssigkeitsmasse sich als normales Darmsekret sowohl nach seinen fermentativen wie auch chemischen Eigenschaften charakterisiert, so ist doch immerhin die Möglichkeit gegeben, daß neben der Sekretion auch Transsudationsvorgänge vor sich gehen. Von diesem Gesichtspunkte aus wurde daher einem Hunde in nüch-

[1]) u. [2]) Hammarstens Lehrb. d. physiol. Chem., 8. Aufl. 1914, S. 463.

[3]) Meyer und Gottlieb, Die experimentelle Pharmakologie, 2. Aufl. 1911.

ternem Zustande Karlsbader Salz und Magnesiumsulfat verabreicht und der wässerige Kot untersucht.

Das Purgen dagegen ist ein Mittel, das im Dünndarm wohl nur sekretorisch wirkt und im Dickdarm milde Reizung und Kotentleerung hervorruft.

Tabelle des Versuchs 8.

Versuchs-Nr.	Abführungsmittel und Dosis	Beschaffenheit des Kotfiltrates	Gesamt-N-Gehalt %	Gesamt-globulin N-Gehalt %	N-Quotient	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung			
							P.	E.	F.	N.
1	Karlsbader Salz 40 g Wasser 200 ccm auf 1 mal	Filtrat ganz klar, blaßgelblich.	0,070	0,025	2,000	—	++	+	—	—
2	Magnes.-Sulfat 30 g, Wasser 200 ccm auf 1 mal	Bräunlich gelblich klar. Kot gering. Schleim gemischt.	0,280	0,140	1,000	—	+	+ wenig	—	—
3	Magnes.-Sulfat 30 g, Wasser 200 ccm auf 1 mal	do.	0,210	0,098	1,143	—	++	+	—	—
4	Porgen 0,6 Wasser 200 ccm auf 1 mal	do.	0,154	0,056	1,750	—	++	+ Spur	—	—

Aus obiger Tabelle ist ersichtlich, daß in eben nach verschiedenen Abführmitteln (salinische Mittel und Purgen) entleerten Darminhalten mit Essigsäure fällbare Eiweißsubstanzen fehlen.

Tabelle des Versuchs 9.

Versuchs-Nr.	Kalomeldosis	Beschaffenheit des Kotfiltrates	Gesamt-N-Gehalt %	Gesamt-globulin N-Gehalt %	N-Quotient	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung			
							P.	E.	F.	N.
1	0,3 Wasser 200 ccm auf 1 mal	Klar bräunlich, Reaktion alkalisch.	0,182	0,098	0,857	+	++	+	+ wenig	—
2	0,5 Wasser 200 ccm auf 1 mal	Klar dunkelbräunlich, Reaktion alkalisch.	0,280	0,154	0,818	+++	++	+	+ wenig	—
3	0,6 Wasser 200 ccm auf 1 mal	Kot ziemlich reichlich, mit Schleim gemengt.	0,252	0,140	0,800	++	++	+	+ wenig	—

c) Darminhalt bei Exsudaten der Darmwand.

Kalomel wirkt reizend auf die Dünndarmschleimhaut und ruft, in großen Dosen angewandt, eine Enteritis hervor. Die Darreichungsweise ist in vorstehender Tabelle angegeben.

Obige Tabelle zeigt, daß die Darmexsudate mit Essigsäure fällbare Eiweißkörper enthalten und der N-Quotient bedeutend herabgesetzt ist. Dieses Resultat stimmt mit den bei anderen Exsudaten gewonnenen vollständig überein.

4. Nachweis bei experimenteller Nephritis.

Bei durch Urannitratinjektion hervorgerufener Kaninchennephritis war im Harn die Rivaltasche Reaktion stets positiv. Die geringe vorhandene Harnmenge gestattete leider die quantitative Bestimmung nicht. Im Harn der zwei Hunde, bei denen durch einseitige Nierenvenenunterbindung Stauungsniere erzielt wurde, war keine Rivaltasche Reaktion zu konstatieren gewesen. (Nach dem Esbachschen Albuminometer betrug der Eiweißgehalt 1 bis 2 ‰.) Herr Dr. Porges war so liebenswürdig, mir das Harnmaterial zu diesem Versuch zur Verfügung zu stellen.

In Fällen, wo durch starke Reizung der Harnkanälchen eine Nephritis hervorgerufen wurde, ist es erklärlich, daß die Rivaltasche Reaktion positiv ausfiel.

Zusammenfassung.

1. In experimentellen Transsudaten der serösen Häute ist kein mit Essigsäure fällbarer Eiweißkörper enthalten.
2. In experimentellen Exsudaten derselben findet er sich stets.
3. Bei experimenteller Nierenentzündung kommt er im Harn vor, fehlt dagegen bei einfacher Stauung der Niere.
4. In normalen Magen- und Darmsäften und in Transsudaten des Verdauungstraktus ist er nie nachzuweisen, dagegen stets in Exsudaten derselben.
5. Das Pseudoglobulin scheint keine Relation zu ihm zu haben, wogegen das Fibrinoglobulin in inniger Beziehung zu ihm steht.

III. Die Bildungsstätte dieses Eiweißkörpers.

Bei der Entstehung von Transsudaten und Exsudaten findet nach der Meinung der Autoren ein Übertritt von Flüssig-

keit aus dem Blute in die serösen Höhlen, das Unterhautzellgewebe oder in irgendeine krankhaft veränderte Stelle statt. Um die Herkunft eines durch Essigsäure fällbaren Eiweißkörpers festzustellen, muß zunächst das Blutserum untersucht werden, da die Exsudate der Pleura und des Peritoneums mehr die Eigenschaften von Blutseren als die der Blutplasmen zeigen.

1. Untersuchung im Blutserum.

Beim Hund wurde das Blut durch Jugularpunktion gewonnen und bei den Kaninchen aus den Ohrvenen oder der Carotis. Durch Defibrinieren und Zentrifugieren wurde das Serum gewonnen.

Nach Hammarsten[1]) und Huiskamp[2]) findet sich das Fibringlobulin in normalem Serum nur in geringer Menge und wird schon bei 28 $^0/_0$ iger Sättigung mit $(NH_4)_2SO_4$-Lösung gefällt. Leider konnte ich es nicht in normalem Serum mit dieser fraktionierten Fällungsmethode, sondern nur andeutungsweise in einigen pathologischen Seren nachweisen.

Resultat:

1. Obschon das normale Blutserum ziemlich reichliche Mengen Pseudoglobulinfraktion und eine mäßige Menge Euglobulinfraktion enthält, fehlt darin der sog. essigsäurefällbare Eiweißkörper resp. die Fibringlobulinfraktion. Nur bei den durch intraperitoneale Injektion der Pneumokokkenkultur erzeugten Fieberfällen zeigen sich Andeutungen der Rivaltaschen Reaktion und F-Fraktion.

2. Der Eiweißquotient ist sowohl bei hämolysiertem Serum wie auch in Fällen von künstlichem Fieber herabgesetzt, gleich wie bei der Untersuchung Langstein und Mayers[3]), dagegen ist er ziemlich groß bei der Urannephritis.

---

[1]) Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem. (Hammarstens), 8. Aufl. 1914, S. 242.

[2]) Huiskamp, Zur Fibringlobulinfrage. Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 1905. — Derselbe, Bemerkungen zur Fibringlobulinfrage. Ebenda **46**, 1905.

[3]) Langstein und Meyer, Über das Verhalten der Eiweißkörper des Blutplasmas bei experimenteller Infektion. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **8**, 69, 1905.

Tabelle des Versuchs 10.

Versuchstiere	Versuch Nr.	Gesamt-Eiweißgehalt %	Gesamt-Globulingehalt %	Eiweißquot.	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung P.	Frakt. Fällung E.	Frakt. Fällung F.	Frakt. Fällung N.	Bemerkungen
Hund I	1	6,038 (N) 0,966	2,878 (N) 0,462	1,098	–	++	+	–	–	Serum etwas hämolysiert.
	2	6,075 (N) 0,972	2,538 (N) 0,406	1,394	–	++	+	–	–	
	3	4,813 (N) 0,770	2,363 (N) 0,378	1,036	+ Andeutung	++	+	Trübung	Trübung	Pneumokokkenbouillonkultur 3,0 ccm intraperitoneal injiziert, nach 24 Std. Blutentnahme. Analtemperatur 39,1°.
Hund II	1	4,900 (N) 0,784	1,318 (N) 0,210	1,978	–	++	+	–	–	
	2	4,900 (N) 0,784	2,100 (N) 0,336	1,333	–	++	+	–	–	Niedergeschlagen, kein Appetit.
	3	5,513 (N) 0,882	2,625 (N) 0,420	1,102	+ Andeutung	++	+	Trübung	–	Pneumokokkenkultur 2,0 ccm intraperitoneal injiziert. Nach 24 Std. Blutentnahme. Analtemperatur 39,4°.
Kaninchen I	1	6,913 (N) 1,106	2,975 (N) 0,476	1,334	–	+	–	–	–	
	2	6,825 (N) 1,092	3,149 (N) 0,504	1,167	–	+	+ schwach	–	–	Etwas hämolysiert.
	3	3,850 (N) 0,616	1,050 (N) 0,168	2,666	–	++	+ schwach	–	–	Infolge Urannitratinjektion Albuminurie deutlich.
Kaninchen II	1	7,000 (N) 1,120	2,625 (N) 0,420	1,666	–	++	+ schwach	–	–	Aleuronat intraperitoneal injiziert. Ascites zeigt deutliche Rivaltasche Reaktion.
	2	6,125 (N) 0,980	2,800 (N) 0,448	1,188	–	++	+ schwach	–	–	
Kaninchen III	1	6,825 (N) 1,092	2,975 (N) 0,476	1,294	–	++	+	–	–	
	2	6,213 (N) 0,994	1,925 (N) 0,308	2,228	–	++	+	–	–	
	3	3,850 (N) 0,616	1,750 (N) 0,280	1,200	–	++	+	–	–	Pneumokokkenbouillonkultur 1,0 ccm intraperitoneal injiziert, nach 48 Std. Blutentnahme.
Meerschweinchen	1	6,825 (N) 1,092	2,275 (N) 0,364	2,000	–	+	+	–	–	

Aus obigen Resultaten kann man schließen, daß das Vorkommen des mit Essigsäure fällbaren Eiweißkörpers in den serösen Höhlen, dem Verdauungstraktus und dem Urin bei Entzündung nicht auf einer pathologisch veränderten Perimentität der Capillarwände beruht, und daß es nicht aus dem Blute stammt, sondern an Ort und Stelle der Entzündung hervorgerufen wird.

2. Untersuchung der Organextrakte.

Im vorigen Kapitel wurde schon experimentell nachgewiesen, daß bei der experimentellen Entzündung der serösen Höhlen, des Digestionstraktus und der Niere der sog. essigsäurefällbare Eiweißkörper immer positiv im Exsudate der betreffenden Gewebe vorkommt. In diesem Kapitel soll weiter über den direkten Nachweis dieses Eiweißkörpers in den betreffenden Geweben gesprochen werden.

Die Schleimhaut des Magendarmes wurde abgeschabt, die Muskelschicht desselben, das Peritoneum und die Niere feingehackt, mit physiologischer Kochsalzlösung 20%ige Lösungen hergestellt, unter Toluolzusatz im Eisschrank 12 Stunden stehen lassen, koliert, zentrifugiert und filtriert, so lange, bis die Filtrate ganz klar wurden, und dann diese Filtrate untersucht. Das Untersuchungsverfahren entspricht genau dem des früheren Versuchs.

Bei diesem Nachweis stieß ich auf folgende Schwierigkeiten. Fast sämtliche Gewebe, besonders die inneren Organe, enthielten konstant Globuline und Nucleoproteid, die beide mit Wasser oder verdünnter Neutralsalzlösung mehr oder weniger extrahierbar sind. Um beide Substanzen zu differenzieren, benutzt man den Phosphornachweis der betreffenden Substanzen.

Auch ist es sehr schwer, die wässerigen Organextrakte durch gewöhnliches Filtrierpapier ganz klar zu filtrieren. Diese geringgradige Trübung scheint höchtswahrscheinlich von einem wasserunlöslichen, und zwar mit Lecithin festgebundenen Globulinanteil herzurühren, wie Joachim[1]) nachgewiesen hat. Wenn man bei fraktionierter Globulinfällung einen solchen Globulinanteil weiter analysieren wird, wird man darin Phosphor auffinden und ihn als Nucleoproteid behandeln. Deshalb war es

[1]) Joachim, Über die Ursache der Trübung in milchiger Ascitesflüssigkeit. Münch. med. Wochenschr. 44, 1903.

unbedingt nötig, daß die geringe Trübung des Organextraktes entfernt wurde.

Diese Frage soll aber an dieser Stelle nicht eingehend behandelt werden, sondern es soll nur der Nachweis der sog. essigsäurefällbaren Eiweißkörper in dem ganz klaren wässerigen Organextrakte besprochen werden.

Tabelle des Versuchs 11.

Versuchstiere	Untersuchte Gewebe	Gesamt-N-Gehalt %	Gesamt-Globulin-N-Gehalt %	N-Quotient	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung			
						P.	E.	F.	N.
Hund	Magen, Schleimhaut	0,176	0,070	1,511	+	+	+	+	–
	Magen, Muskelschicht	0,126	0,058	1,251	+	++	++	+	–
	Duodenum, Schleimhaut	0,168	0,084	1,000	++	+	+	+	–
	Duodenum, Muskelschicht	0,140	0,098	0,427	+	++	+	+	–
	Ileum, Schleimhaut	0,224	0,084	1,686	++	++	+	+	–
	Ileum, Muskelschicht	0,154	0,084	0,834	++	++	++	+	–
	Colon, Schleimhaut	0,252	0,126	1,011	++	++	++	+	Trübung
	Colon, Muskelschicht	0,140	0,078	0,788	++	++	+	+	–
Kaninchen	Niere, normal (im Eisschr. extrahiert)	0,224	0,154	0,455	++	++	+	+	–
	Niere, Pneumokokkeninfekt. (b. Zimmertemp. extrahiert)	0,210	0,084	1,500	+	++	+	+	–
Hund	Peritoneum	0,210	0,140	0,500	++	++	++	+	–
	Niere	0,168	0,084	1,000	++	+	+	+	–

Lönnberg[1]) hat schon vor 2 Dezennien bezüglich des Ursprungs der essigsäurefällbaren Eiweißsubstanz im Harn die Proteinsubstanz der Niere untersucht, und dabei konnte er keine durch Essigsäure fällbare, in überschüssiger Essigsäure unlösliche Substanz, die in das Wasser übergeht, nachweisen, während er, als die mit Wasser erschöpfte Nierenmasse mit schwacher Natronlauge extrahiert wurde, erst eine essigsäurefällbare Substanz mit schwach alkalisch gemachtem Wasser extrahieren konnte. Dies stimmt mit meinen Untersuchungen in gewissem Sinne überein, daß in dem frisch getöteten und nur kurze Zeit extrahierten Organsaft der mit Essigsäure fällbare Körper nicht übergeht, sondern erst nach 12 stündiger Ex-

[1]) Lönnberg, Beiträge zur Kenntnis der Eiweißkörper der Niere und Harnblase. Skand. Arch. f. Physiol. 3, 1892.

traktion unter Vermeidung der Autolyse (im Eisschrank) in dem Wasser nachweisbar wird. Auch hielt er diese Substanz für Nucleoalbumin. Natürlich hätte dabei nucleinhaltige Substanz mitgefällt werden können, weil diese Substanz, nach seiner Angabe, von einem kleinen Überschuß an Essigsäure leicht gelöst wurde.

Resultate.

Aus obiger Tabelle ist ganz klar ersichtlich, daß die Schleimhäute und die Muskelschicht des Verdauungskanals, das Peritoneum und die Niere ziemlich reichliche Mengen des sog. durch Essigsäure fällbaren Eiweißkörpers enthalten, der bei Entzündung resp. Reizung der betreffenden Organe den betreffenden Gewebeextrakten beigemengt werden kann.

Bisher war es eine unentschiedene Frage, woher in seltenen Fällen das Exsudat größeren Eiweißgehalt als das Blut hat, und man nahm in solchen Fällen hauptsächlich eine krankhaft veränderte Permeabilität der Capillarwände an, wobei man indessen dem reichlichen Gehalt an Formelementen gebührende Rechnung trug.

Auch nahmen einige Autoren an, entsprechend der Anschauung von Heidenhain, daß eine abnorm gesteigerte Sekretionsfähigkeit des Capillarendothels zur Erklärung des hohen Eiweißgehalts der Trans- und Exsudate herangezogen werden kann. Indessen ist das alles ganz einfach zu erklären durch meinen oben erwähnten Nachweis, daß bei entzündlichen Reizungen irgendeines Gewebes durch lokalen Ursprung bestimmte Eiweißsubstanzen an Ort und Stelle der Reizungen dem Transsudat beigemengt werden können, und es wird je nach der Stärke der Reizung ein verschieden hoher Eiweißgehalt erreicht werden.

Natürlich kann man dabei eine veränderte Permeabilität der Capillarwände gelten lassen; sie ist sicher ein wichtiger Faktor bei der Entstehung des Exsudats.

Wenn auch die Eiweißquotienten der Tabelle des Versuchs 11 keine bestimmte Regel zu zeigen scheinen, wird man bei genauerer Beobachtung eine interessante Tatsache auffinden können. Die Schleimhautextrakte aller Abschnitte des Verdauungstraktes zeigen höheren Gesamt-N-Gehalt und höheren N-Quotienten als die Muskelschichtextrakte derselben.

Wahrscheinlich wird dieser Befund vom Fermentreichtum der Schleimhaut herrühren, und zwar dürften die Globuline durch proteolytische Vorgänge mehr oder minder verdaut werden. Obige Tabelle zeigt auch, daß ein bei Zimmertemperatur extrahierter Nierenextrakt einen höheren N-Quotienten hat als ein im Eisschrank gewonnener, wodurch die oben angegebene Tatsache befestigt würde.

Deshalb bietet der N- resp. Eiweißquotient einen gewissen Maßstab für das Vorkommen des sog. essigsäurefällbaren Eiweißkörpers, während die F-Fraktion einen absolut sicheren Wert dafür darstellt.

Hier möchte ich weiter untersuchen, ob diese Eiweißkörper aus Knochenmark, Leber, Milz, den Muskeln und dem Pankreas extrahiert werden können.

Pohl[1]) gab an, daß frisches Gewebsplasma, das 24 Stunden in der Kälte stehen gelassen wurde, schon auf schwachen Essigsäurezusatz durch Niederschläge reagiert, die, selbst mit Säureüberschuß behandelt, ungelöst blieben. Doch nach meiner Untersuchung wurden diese Niederschläge fast alle gelöst, wenn man mit ganz klaren, und zwar durch Tonkerzen abfiltrierten Organextrakten arbeitet. Plósz[2]) fand, daß nach Ausspülung der Leber in 0,75 $^0/_0$ iger Kochsalzlösung ein bei 45° koagulabler, in Essigsäure löslicher, ganz verdaulicher Körper überging. Halliburton[3]) wies in der Leber ein im Überschuß von Essigsäure leicht lösliches Hepatoglobulin nach (Koagulationspunkt 45 bis 50°).

Nach Fürth[4]) gaben sowohl Essigsäure als auch Mineralsäuren in einer Paramyosinogenlösung einen weißen flockigen Niederschlag, der in Säureüberschuß unschwer löslich ist.

Halliburton[5]) gibt an, das Paramyosinogen sei durch Essig-

---

[1]) Pohl, Über Organeiweiß. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 1906.

[2]) Plósz, Über die eiweißartigen Substanzen der Leberzellen. Arch. f. d. ges. Physiol. 5, 1873.

[3]) Halliburton, The Proteide of Kidney and Livercells. Journ. of Physiol. 13, 1893.

[4]) v. Fürth, Über die Eiweißkörper des Muskelplasmas. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 36, 231, 1895.

[5]) Halliburton, On muscle-plasma. Journ. of Physiol. 8, 133, 1887.

säure nicht fällbar und betont diese Eigenschaft als Hauptmerkmal zur Unterscheidung desselben vom Myosinogen.

Außerdem gibt es noch einige andere Beschreibungen über die essigsäurefällbare Eiweißsubstanz des Gewebeextraktes; doch sollen hier die Einzelheiten nicht berührt werden.

Die obengenannten Organe des frisch getöteten Hundes und des Kaninchens wurden fein gehackt, mit physiologischer Kochsalzlösung zu 20 % gemischt, ein Teil im Eisschrank, ein anderer Teil bei Zimmertemperatur (ca. 16°) über Nacht stehen gelassen, koliert, zentrifugiert und filtriert, so lange, bis die Filtrate ganz klar wurden. Das Untersuchungsverfahren ist genau wie bei den obigen Prüfungen.

Tabelle des Versuchs 12.

Versuchstier	Untersuchte Organe	Gesamt-N-Gehalt %	Gesamt-Globulin-N-Gehalt %	N-Quotient	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung				Bemerkungen
						P.	E.	F.	N.	
Kaninchen	Knochenmark (10%)	0,084	0,042	1,000	++	++	+	+ wenig	Trübung	Im Eisschrank extrahiert.
	Milz (10%)	0,126	0,084	0,501	++	++	+	+ wenig	—	
	Leber 1	0,308	0,182	0,692	++	++	++	+	Trübung	
	Leber 2	0,168	0,112	0,500	++	++	++	+	—	
	Muskel	0,252	0,168	0,510	+	++	++	+	—	
Hund	Knochenmark	0,210	0,084	1,501	++	++	+	+ wenig	—	Bei Zimmertemperatur extrahiert.
	Leber	0,238	0,084	1,834	++	+	++	+	—	
	Milz	0,252	0,098	1,569	++	++	++	+	—	
	Muskel	0,196	0,098	1,000	++	+	+	+	—	
	Pankreas	0,350	0,070	4,000	+ schwach	+	Trübung	Trübung	—	

Die klaren Extrakte aller untersuchten Organe enthalten, wie obige Tabelle zeigt, einen essigsäurefällbaren Eiweißkörper, resp. F-Fraktion, die mit der Zunahme der anderen Globulinfraktionen einigermaßen parallel geht, und die N-Fraktion zeigt sich in einigen Fällen nur angedeutet. Die Eiweißquotienten der in der Zimmertemperatur extrahierten Filtrate sind höher als die der im Eisschrank extrahierten, und diese Resultate stimmen mit denen des Versuchs 11 überein.

Aus obigen Experimenten ist ganz klar ersichtlich, daß fast alle Gewebe den sog. essigsäurefällbaren Eiweißkörper beherbergen, der bei Entzündungen aus dem betreffenden Gewebsteil heraussickert, wobei ein Exsudat gebildet wird.

Ob er aus dem Protoplasma oder vom Zellkern herrührt, ist eine sehr schwer zu lösende Frage.

Zusammenfassung.

1. Im normalen Blutserum ist der sog. essigsäurefällbare Eiweißkörper nicht enthalten.

2. Bei experimentellem Fieber scheint er im Blutserum nur andeutungsweise enthalten zu sein.

Er ist im Wasser oder in verdünnter Kochsalzlösung aus fast allen Organen extrahierbar und wird an Ort und Stelle der Entzündung dem Transsudat beigemengt.

4. Der Eiweißgehalt des Exsudats kommt nicht nur durch die veränderte Permeabilität der Capillarwände aus dem Blut, sondern auch an Ort und Stelle der Entzündung aus einem aussickernden Gewebssafte her.

5. Er scheint durch autolytische Vorgänge empfindlicher als andere Globulinfraktionen beeinflußt werden zu können.

IV. Die Beziehung dieses Eiweißkörpers zu autolytischen Vorgängen.

Obschon der essigsäurefällbare Eiweißkörper, wie oben nachgewiesen, bei Entzündungen in allen Geweben stets vorkommen sollte, fehlt er in Fällen von Leichenmaterialien, bei denen die Obduktionsbefunde sicher entzündliche Erscheinungen gezeigt haben, fast konstant, wie früher Rivalta richtig betont hat.

Diejenigen Exsudate, die als fermentreich betrachtet werden, oder in denen fermentative Vorgänge stattfinden könnten, zeigen stets, wie ich auch im vorigen Kapitel betont habe, höhere N-Quotienten als die der fermentarmen oder nicht autolysierten Gewebsextrakte.

In diesem Kapitel wird über die Beziehung des autolytischen Vorganges zu sog. essigsäurefällbaren Eiweißkörpern berichtet.

Versuch.

Leber- und Muskelbrei eines frisch durch Verblutung getöteten Hundes werden einzeln in je 4 Teile geteilt und abgemessen; je eine der 4 Portionen wird ganz genau mit $20\,^0/_0$ gesättigtem Chloroformwasser gemischt.

I. Portion wurde nach 2 Stunden langem Stehen im Eisschrank,

II. Portion nach 24stündigem,

III. Portion nach 48stündigem,

IV. Portion nach 96stündigem Einlegen im Brutofen (37°) untersucht.

Tabelle des Versuchs 13.

Versuch	Versuchs-material	Gesamt-N-Gehalt %	Gesamt-globulin-N-Gehalt %	N-Quot.	Rivaltasche Reaktion	Frakt. Fällung P.	E.	F.	N.
I. Portion	Hundefleisch	0,1540	0,0728	1,114	—	+ wenig	+ Spur	—	—
	Hundeleber	—	—	—	—	+ „	+ „	—	—
II. Portion	Hundefleisch	0,1428	0,0420	2,000	—	+ „	+ „	—	—
	Hundeleber	0,2940	0,0640	3,565	±	++	+ wenig	—	—
III. Portion	Hundefleisch	0,1232	0,0420	1,933	—	+	+ „	—	—
	Hundeleber	0,2604	0,0476	4,471	—	+	+ „	—	—
IV. Portion	Hundefleisch	0,1204	0,0280	3,271	—	+	+ Spur	—	—
	Hundeleber	0,3052	0,0476	5,411	—	+	+ „	—	—

Resultate.

I. Portion enthält keinen sog. essigsäurefällbaren Eiweißkörper, während das im Eisschrank aufbewahrte Extrakt stets positiv ist, wie ich schon oben erwähnt habe. In den übrigen Portionen wurde stets eine negative Rivaltasche Reaktion gefunden; der Autolysationszeit proportionell nahmen der Gesamt-Globulin-N-Gehalt ab und die N-Quotienten fast immer zu.

Diese Resultate illustrieren, daß dieser Eiweißkörper, der als solcher im Gewebe vorkommt, nach 2stündiger Extraktion im Eisschrank nicht in das Wasser oder die verdünnte Kochsalzlösung übergeht, erst nach 12 Stunden deutlich in dem Extrakt nachweisbar ist, doch zu einer Zeit, wo die Autolyse stattgefunden haben könnte, schon nach 24 Stunden fast ganz abgebaut wird und durch weitere Autolyse ganz spurlos verschwindet. Bei der Autolyse werden die anderen Globulin-

fraktionen in Mitleidenschaft gezogen, und zwar verschwindet die E-Fraktion nach 96 Stunden fast völlig.

Inwieweit im Leben unter physiologischen Verhältnissen autolytische Vorgänge vonstatten gehen, kann gegenwärtig nicht festgestellt werden, denn das Blutserum enthält einen autolysehemmenden Körper, und auch in pathologischen Ergüssen sind keine proteolytische Fermenten nachweisbar, wie Wiener[1]) zeigte, und hieraus kann man höchstens vermuten, daß die Autolyse zu Lebzeiten in demjenigen Organteil, der infolge der Zirkulationsstörung nicht mehr in normaler Weise ernährt wird, vonstatten gehen kann.

Oben erwähnte Tatsachen machen es verständlich, daß dieser Eiweißkörper im Exsudat zu Lebzeiten nicht zerlegt wird, während nach dem Tode sofort eine Autolyse eintritt und die Rivaltasche Reaktion sich nicht mehr zeigt.

V. Über das Wesen dieses Eiweißkörpers.

Wie ich schon oben beschrieben habe, nimmt, wenn der sog. essigsäurefällbare Eiweißkörper im Exsudat oder wässerigen Organextrakte positiv vorhanden ist, der Gesamt-Globulin-N-Gehalt zu und die F-Fraktionen fallen konstant positiv aus.

Deshalb wurde das Gesamt-Globulin und die F-Fraktion der Organextrakte mittels Magnesiumsulfat und Ammonsulfat ausgefällt, um die Eigenschaften dieses Eiweißkörpers zu erforschen.

Die Gewebsextrakte sind aber komplizierter als die Pleura- und Peritonealergüsse, die in meiner früheren Arbeit[2]) besprochen wurden.

Zum Versuche werden die Muskel- und Leberextrakte eines frisch getöteten Kaninchens gewählt.

Zu den mit Wasser extrahierbaren Globulinen des toten Muskels gehören das Myosin, Muskulin und Myoglobulin. Auch sind die verschiedenen Globuline der Leber von Plósz[3]),

[1]) Wiener, Über das Vorkommen proteolytischer Fermente in Exsudaten. Diese Zeitschr. 41, 149.

[2]) Ujihara, Beitrag zur Kenntnis der durch Essigsäure fällbaren Eiweißsubstanz in serösem Erguß, nebst ihrem klinischen Wert. Berl. klin. Wochenschr. 1914 (bald erscheinend).

[3]) Plósz, Über die eiweißartigen Substanzen der Leberzellen. Arch. f. d. ges. Physiol. 5, 1873.

Halliburton[1]), Pohl[2]) und Dastre genau untersucht worden.

Welcher Art der Serumglobuline sie entsprechen, kann man nicht mit Bestimmtheit feststellen.

Trotz der noch herrschenden Unklarheit dürfte meine Untersuchung wenigstens etwas zutage geführt haben.

Versuch.

200 g gehackte Muskeln und 100 g gehackte Leber eines Kaninchens werden mit 20 °/₀ physiologischer Kochsalzlösung gemischt, 12 Stunden lang im Eisschrank extrahiert, koliert, zentrifugiert und filtriert, eine geringe Trübung bleibt jedoch bestehen.

1. Diese Extrakte wurden mit Berkefeldschem Filter abfiltriert, denn es sollte beobachtet werden, ob der essigsäurefällbare Eiweißkörper durch Tonkerzen abfiltrierbar ist. Diese ganz klar abfiltrierten Filtrate zeigen deutliche Rivaltasche Reaktion und F-Fraktion. Nach Joachim[3]) scheint die Trübung von einem im Wasser unlöslichen Pseudoglobulin verursacht zu sein. Aus diesem schönen Resultat Joachims und meinen oben angegebenen Versuchen dürfte man leicht schließen, daß Pseudoglobulin, mitsamt dessen in Wasser löslichem und unlöslichem Teile kein sog. essigsäurefällbarer Eiweißkörper ist.

2. Das klare, mit dem Berkefeldschen Filter abfiltrierte Filtrat wurde mit Magnesiumsulfat gesättigt, 24 Stunden an einen kühlen Ort gestellt, dann filtriert und mit gesättigter Magnesiumsulfatlösung so lange nachgewaschen, bis das Filtrat keine Eiweißreaktion mehr zeigte. Der Rückstand wurde jetzt in destilliertem Wasser gelöst, dabei blieb ein geringer Teil davon ungelöst. Diese Lösung wurde abfiltriert, das Filtrat 3 Tage in fließendem Wasser, 1 Tag in destilliertem Wasser dialysiert und wiederum abfiltriert.

---

[1]) Halliburton, The Proteide of Kidney and Livercells. Journ. of Physiol. **13**, 1893.

[2]) Pohl, Über Organeiweiß. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **17**, 1906.

[3]) Joachim, Über die Ursache der Trübung in milchiger Ascitesflüssigkeit. Münch. med. Wochenschr. **44**, 1903.

Filtrat: Rivaltasche Reaktion negativ.

Rückstand mit destilliertem Wasser so lange gewaschen, bis das Filtrat keine Eiweißreaktion mehr zeigte. Der gewaschene Rückstand sollte in physiologischer Kochsalzlösung gelöst werden, doch ging nicht alles in Lösung. Der ungelöste Teil wurde abfiltriert.

Durch Zusatz von Natriumcarbonatlösung erfolgte erst die Lösung, die eine deutliche Rivaltasche Reaktion zeigte.

Dies könnte indes durch Reaktionsumschlag hervorgerufen sein, also nicht unbedingt durch die essigsäurefällbare Eiweißsubstanz. Über das Vorhandensein des in verdünnter neutraler Salzlösung ungelöst gebliebenen Anteiles der dialysierten Globuline stimmen meine Erfahrungen mit der schon früher von Hammarsten, Freund und Joachim[1]) bestätigten Tatsache überein. Denn es kann sich bei dem durch Dialyse wasserunlöslich gemachten Globuline vielleicht nicht mehr um denaturierte Teile des normalen Globulins handeln. Durch Dialyse und andere Behandlung sollte die Eiweißsubstanz direkt nachgewiesen werden, unter Benutzung obiger Tatsachen ging ich indes indirekt vor, da es sich nicht mehr um denaturiertes Eiweiß handelte.

3. Muskel und Leber eines frisch getöteten Hundes wurden gehackt, in physiologischer Kochsalzlösung zu 20 $^0/_0$ gemischt und im Eisschrank extrahiert. Die erste Portion wurde nach 2, die zweite nach 12 Stunden durch Berkefeldsche Kerzen filtriert, mit den Filtraten wurden die Versuche angestellt.

	Rivaltasche Reaktion	Fraktionierte Fällung			
		P.	E.	F.	N.
I. Portion	—	+	+ gering	—	—
II. Portion	++	++	++	+	—

Bei der ersten Portion war die Rivaltasche Reaktion sowie die F-Fraktion negativ, doch bei der zweiten Portion waren beide Reaktionen deutlich positiv.

Der zweiten Portion wurden zu 28 $^0/_0$ gesättigte Ammonsulfatlösung zugesetzt und das ganze 24 Stunden lang an

[1]) Freund und Joachim, Über Serumglobulin. Centralbl. f. Physiol. 16, 1902.

einem kühlen Orte belassen. Der ausgeschiedene Niederschlag (F-Fraktion) wurde abfiltriert.

Filtrat (P- und E-Fraktion vorhanden?): Rivaltasche Reaktion negativ.

Rückstand. 72 ccm destilliertem Wasser wurden 28 ccm gesättigte Ammonsulfatlösung zugesetzt, der Rückstand damit gewaschen, bis keine Eiweißreaktion in dem Filtrate mehr vorhanden war. Bei Zusatz von destilliertem Wasser löste sich dieser Rückstand fast völlig. Es wurde wiederum filtriert, das Filtrat gab die Rivaltasche Reaktion positiv. Das Filtrat wurde dann 4 Tage lang in fließendem, 2 Tage in destilliertem Wasser dialysiert und endlich filtriert.

Filtrat: Eiweißreaktion schwach positiv, Rivaltasche Reaktion negativ.

Rückstand. (Um zu untersuchen, ob der Rückstand noch Ammonsulfat enthielt, wurde ein Teil des Rückstandes in destilliertem Wasser gekocht und dann filtriert. Einem Teil des klaren Filtrats wurde gesättigte Bariumchloridlösung zugesetzt, doch entstand keine Trübung. In den anderen Teil träufelte ich Neßlersche Lösung, keine Ammoniakreaktion.)

Obige Versuche ergaben, daß im Rückstand kein Ammonsulfat vorhanden war.

Der Rückstand wurde in verdünnter Kochsalzlösung gelöst, doch trat nur eine teilweise Lösung ein. Diese Lösung zeigte die Rivaltasche Reaktion negativ. Der ungelöste Teil löste sich nur in Natriumcarbonatlösung, Rivaltasche Reaktion positiv, doch vielleicht nur als Folge des Reaktionsumschlages.

Obige Versuche wurden dreimal wiederholt; sie ergaben stets dieselben Resultate.

Zusammenfassung.

1. Der mit Essigsäure fällbare Eiweißkörper in wässerigem Gewebsextrakte ist mit dem Berkefeldschen Tonfilter filtrierbar.

2. Dieser Eiweißkörper scheint hauptsächlich Fibrinoglobulin neben einer geringen Menge Euglobulin zu sein.

3. Dialysiert man die Globuline längere Zeit, so scheint höchstwahrscheinlich ein Anteil davon seinen denaturierten Charakter zu verlieren.

Beiträge zur Kenntnis der Narkose.

II. Mitteilung.

Der Einfluß der Narkose auf den Gaswechsel des Froschrückenmarks.

Von

Hans Winterstein.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 4. März 1914.)

1. Einleitung.

In einer früheren Mitteilung[1]) habe ich eine Übersicht über die bisher bekannt gewordenen Beziehungen zwischen Narkose und Sauerstoffatmung zu geben versucht. Als notwendige Voraussetzung für ein weiteres Studium erschien mir eine vergleichende Untersuchung der durch die Narkose bewirkten Veränderungen der Erregbarkeit und des Sauerstoffverbrauches unter den gleichen Bedingungen und am gleichen Versuchsobjekt. Denn indirekte Schlußfolgerungen, die aus dem Verhalten der Erregbarkeit bei verschiedener O_2-Zufuhr u. dgl. gezogen werden, sind, wie schon früher erwähnt und wie die folgenden Mitteilungen auf das deutlichste dartun werden, durchaus unzuverlässig, so zwingend sie mitunter erscheinen mögen, und anderseits kann auch eine direkte Untersuchung des Einflusses von Narkoticis auf die Oxydationsprozesse in den Geweben, wie sie neuerdings mehrfach durchgeführt wurde, über die Beziehungen zwischen Narkose und Gewebsatmung nichts aussagen, wenn sie nicht unter gleichzeitiger Berücksichtigung der „narkotischen Wirkung“ durchgeführt wird. Während diese Untersuchungen im Gange waren, sind einige

[1]) H. Winterstein, Beiträge zur Kenntnis der Narkose. I. Mitteil. Diese Zeitschr. 51, 143, 1913.

Arbeiten erschienen, die zum Teil von ganz analogem Gesichtspunkte aus diese Frage behandeln.

Wie schon früher (I. Mitteil., S. 163) erwähnt, hatte bereits Warburg[1]) beobachtet, daß Phenylurethan in einer Konzentration, welche Zell- und Kernteilung befruchteter Seeigeleier weitgehend unterdrückt, nur eine geringfügige Herabsetzung der Oxydationsprozesse herbeiführt, die somit nicht als die Ursache der Entwicklungshemmung betrachtet werden kann. Von dieser Beobachtung ausgehend, haben Loeb und Wasteneys[2]) vergleichende Untersuchungen über die Oxydationshemmung durch Cyankali und durch Narkotica an Seeigeleiern angestellt und gefunden, daß KCN die Oxydationsprozesse auf etwa $^1/_8$ herabsetzen muß, um die Furchung zu unterdrücken, während eine Anzahl von Narkoticis (Chloralhydrat, Chloroform, Äthylurethan, verschiedene Alkohole) dies bereits in Konzentrationen tun, in denen sie die Oxydationsvorgänge nicht merklich beeinflussen. Sie haben ferner[3]) an Fundulusembryonen festgestellt, daß KCN erst bei Herabsetzung des O_2-Verbrauches auf $^1/_{14}$ eine Lähmung bewirkt, während durch $CHCl_3$ die Reaktion der Embryonen gegen HCl (durch die sehr lebhafte Bewegungen ausgelöst werden) ohne Herabsetzung der Oxydationsprozesse unterdrückt werden kann. An der Medusenart Gonionemus wurde durch Äthylurethan der Gaswechsel zwar stark vermindert (vermutlich vor allem wegen des Fortfalles der Muskelspannung), aber auch hier war eine 3 mal so starke Herabsetzung der Oxydationsvorgänge erforderlich, um durch KCN die gleiche Reaktionslosigkeit herbeizuführen wie durch Äthylurethan. In allen diesen Fällen also konnte die Herabsetzung der Oxydationsgeschwindigkeit, soweit eine solche überhaupt vorhanden war, nicht die Ursache der durch die Narkose bewirkten Lähmung darstellen.

Alexander und Cserna[4]) haben den Einfluß der Narkose

[1]) O. Warburg, Über die Oxydationen in lebenden Zellen nach Versuchen am Seeigelei. Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 305, 1910.

[2]) J. Loeb and H. Wasteneys, Is narcosis due to asphyxiation? Journ. of Biolog. Chem. **14**, 517, 1913.

[3]) J. Loeb und H. Wasteneys, Narkose und Sauerstoffverbrauch. Diese Zeitschr. **56**, 295, 1913.

[4]) F. G. Alexander und St. Cserna, Einfluß der Narkose auf den Gaswechsel des Gehirns. Diese Zeitschr. **53**, 100, 1913.

durch Äther, Morphium und Magnesiumsulfat auf den Gaswechsel des Gehirns curarisierter Hunde untersucht, der durch Entnahme von Blutproben aus der Carotis und dem Sinus sagittalis gemessen wurde, und in allen Fällen eine sehr starke Herabsetzung des Gaswechsels beobachtet; diese betraf beim Äther die O_2-Aufnahme viel stärker als die CO_2-Abgabe, während es sich beim Morphium gerade umgekehrt verhielt, was nach den Autoren für eine völlige Verschiedenheit des Mechanismus der beiden Narkosearten sprechen würde. Da aber Alexander und Révécz[1]) in früheren Untersuchungen nachgewiesen hatten, daß schon optische Reize eine beträchtliche Steigerung des Gaswechsels des Gehirns herbeiführen, und da die Autoren in ihren neuen Untersuchungen eine gewisse Proportionalität zwischen der Tiefe bzw. Vollständigkeit der Narkose und der Herabsetzung des Gaswechsels beobachteten, die sie selbst als einen Beweis dafür ansehen, „daß die Größe des Sauerstoffverbrauches des Gehirns von seinem Tätigkeitszustande (Erregungszustande) abhängt", so liegt es offenbar nahe, die beobachtete Herabsetzung des Gaswechsels in erster Linie auf den mehr oder minder weitgehenden Fortfall der Tätigkeit der verschiedenen Hirnteile zu beziehen, und irgendwelche Schlußfolgerungen auf den Mechanismus der Narkose erscheinen kaum angängig.

Als geradezu ideales Versuchsobjekt für den geplanten Zweck erschien mir das isolierte Froschrückenmark, das unter ganz gleichen und leicht zu übersehenden Bedingungen die Durchführung vergleichender Untersuchungen der verschiedenen physiologischen Vorgänge gestattet.

2. Methodik.

Die Isolierung des Rückenmarks und die Herstellung des Reflexpräparates erfolgte im wesentlichen nach meinen früheren Angaben[2]). Zum Studium des Gaswechsels diente der neuerdings von mir beschriebene Mikrorespirationsapparat in der

---

[1]) F. G. Alexander und G. Révécz, Über den Einfluß optischer Reize auf den Gaswechsel des Gehirns. Diese Zeitschr. 44, 95, 1912. — F. G. Alexander, Untersuchungen über den Blutgaswechsel des Gehirns. Ibid. S. 127.

[2]) H. Winterstein, Über den Mechanismus der Gewebsatmung. Zeitschr. f. allg. Physiol. 6, 315, 1907.

für die Messung der Gewebsatmung modifizierten Form[1]). Die Untersuchung erfolgte entweder in gasförmigem oder in flüssigem Medium, stets aber unter dem Druck einer Atmosphäre von reinem Sauerstoff. In meinen ersten Untersuchungen über den Gaswechsel des isolierten Froschrückenmarks[2]) hatte ich den O_2-Verbrauch bei Zimmertemperatur, unreduziert, zu beiläufig 260 bis 300 cmm pro Gramm und Stunde berechnet, in den späteren mit dem Thunbergschen Mikrorespirometer ausgeführten Messungen[3]) zu meist 200 bis 260. Etwas niedrigere Werte erhielt Scaffidi[4]), nämlich 177,0 bis 217,2, im Mittel 202,3 cmm pro Gramm und Stunde. Seine Versuche sind jedenfalls auch in einer Sauerstoffatmosphäre ausgeführt, aber bei niedrigerer Temperatur (11 bis 13°), wodurch die geringere Größe des Gaswechsels ausreichend erklärt ist. In einem flüssigen Medium wurde der O-Verbrauch des Froschrückenmarks zuerst von Usui[5]) unter Warburgs Leitung bestimmt. Usui fand den O-Verbrauch bei 20° bloß zu 63 bis 94 cmm pro Gramm und Stunde. Er untersuchte die Atmung in Ringer-Lösung, der zur Vermehrung des „O-Vorrats" 10% Rinderblutkörperchen zugesetzt waren, unter dem O-Druck der Luft. Für vergleichende Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Gifte sind die Werte von Usui ganz wohl brauchbar, aber völlig verfehlt wäre es, sie auch nur annähernd als den Ausdruck des normalen O-Verbrauchs anzusehen, wie dies Warburg[6]) kürzlich getan hat. Bei jedem ausgeschnittenen Organ erfolgt die O-Aufnahme ja unter ganz abnormen Bedingungen, nämlich durch Diffusion von außen. Will man sie als Maßstab des physiologischen Verhaltens betrachten, so ist dies nur dann zulässig, wenn man sich überzeugt hat, daß die

---

[1]) H. Winterstein, Ein Apparat zur Mikroblutgasanalyse und Mikrorespirometrie. Diese Zeitschr. **46**, 430, 1912. — Ein Mikrorespirationsapparat. Zeitschr. f. biol. Technik u. Methodik **3**, 246, 1913.

[2]) Winterstein, Über den Mechanismus der Gewebsatmung. l. c.

[3]) H. Winterstein, Der respiratorische Gaswechsel des isolierten Froschrückenmarks. Centralbl. f. Physiol. **21**, 869, 1908.

[4]) V. Scaffidi, Über den Atmungsstoffwechsel der Nervenfasern nach ihrer Resektion. Diese Zeitschr. **25**, 24, 1910.

[5]) R. Usui, Über Messung von Gewebsoxydationen in vitro (Leber, Zentralnervensystem). Arch. f. d. ges. Physiol. **147**, 100, 1912.

[6]) O. Warburg, Beiträge zur Physiologie der Zelle usw. Ergebnisse d. Physiol. **14**. Jahrg., **1914**, 253.

O-Zufuhr durch Diffusion ausreicht, um den O-Bedarf des Organs zu befriedigen. Nun wissen wir aus den Untersuchungen von Baglioni[1]) und mir[2]), daß das isolierte Froschrückenmark unter dem Druck einer O-Atmosphäre viele Stunden, ja 1 bis 2 Tage, seine Reflexerregbarkeit vorzüglich zu bewahren vermag, also jedenfalls ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird, während unter gewöhnlichem Luftdruck innerhalb einiger Stunden Erstickung eintritt. Durch den Zusatz der Blutkörperchen wird zwar der „O-Vorrat" der Flüssigkeit vergrößert, nicht aber der für die Diffusion allein maßgebende O-Druck. Das Rückenmark befand sich mithin unter den Bedingungen der Erstickung, infolge unzureichender O-Zufuhr, wodurch die viel zu niedrigen Werte des O-Verbrauchs erklärt sind.

Schon bei Beschreibung des Mikrorespirationsapparates (l. c.) habe ich die Kautelen erwähnt, die zu beobachten sind, um bei Untersuchung in einem flüssigen Medium für einen ausreichend schnellen Ersatz des durch die Atmung verbrauchten Sauerstoffs zu sorgen. Gleichwohl hat sich aus einer größeren Anzahl von Bestimmungen ergeben, daß der O-Verbrauch in einem flüssigen Medium meist etwas geringer ist als in einem gasförmigen (bei gleichem O-Druck). Von 41 bei einer Temperatur von 17 bis 22° ausgeführten Bestimmungen des Gaswechsels unter normalen Bedingungen ergaben 24 in einer O-Atmosphäre ausgeführte Messungen Werte von 174,7 bis 385,7, im Mittel 273,4 cmm pro Gramm und Stunde (reduziert auf 0° und 760 mm Hg), dagegen 17 in einem flüssigen Medium (Frosch-Ringer- oder 0,7%ige NaCl-Lösung) angestellte Versuche 164,8 bis 282,5, im Mittel 219,5 cmm pro Gramm und Stunde. Ob diese Differenz auf die schlechtere O-Versorgung oder auf einen besonderen Einfluß des flüssigen bzw. gasförmigen Mediums zurückzuführen ist, habe ich nicht untersucht. Zwischen dem O-Verbrauch in Ringer-Lösung und in physiologischer NaCl-Lösung war kein deutlicher Unterschied feststellbar, wie auch die Erregbarkeit des Präparates in beiden Lösungen viele Stunden lang keine Veränderung erfährt.

---

[1]) S. Baglioni, La fisiologia del midollo spinale isolato. Zeitschr. f. allg. Physiol. 4, 384, 1904.

[2]) H. Winterstein, Über den Mechanismus der Gewebsatmung. A. a. O.

Bei der Auswahl der Narkotica war einmal der Umstand maßgebend, daß die stark flüchtigen Stoffe, wie Chloroform oder Äther, nicht bloß schwer zu dosieren sind, sondern auch wegen ihrer hohen Dampfspannung in einem Apparate von so ungeheurer Empfindlichkeit gegen Druckschwankungen jeder Art unanwendbar erschienen. Und so beschränkte ich mich auf die Untersuchung des Einflusses zweier Stoffe, des Äthylurethans und des Alkohols, welch letzterer bereits zu anderweitigen Narkoseversuchen am Zentralnervensystem des Frosches mehrfach verwendet und daher in seiner Wirkungsweise am besten bekannt war. Die Untersuchung in einem flüssigen Medium hatte bei diesen Stoffen keine Schwierigkeit, da sie in beliebiger Konzentration der Atmungsflüssigkeit zugesetzt werden konnten. Bei der Urethannarkose war auch die Untersuchung in einem gasförmigen Medium ohne weiteres durchführbar, da, wie Kontrollversuche am Reflexpräparate ergaben, ein Rückenmark, das durch Eintauchen in eine Urethan-Salzlösung von entsprechender Konzentration narkotisiert worden war, auch unerregbar blieb, wenn man es aus der Lösung heraushob und frei in einer O-Atmosphäre suspendierte. — Anders beim Alkohol. Wurde das Rückenmark eines Reflexpräparates zuerst in z. B. 5%iger Alkohol-Salzlösung bis zum völligen Verschwinden der Erregbarkeit narkotisiert und dann in einer O-Atmosphäre suspendiert, so kehrte allmählich die Erregbarkeit wieder zurück, oft schon nach $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunden. Da dies wohl nur auf einem allmählichen Abdampfen des Alkohols aus dem Organ beruhen konnte, so lag der Gedanke nahe, dies dadurch zu verhindern, daß in die O-Atmosphäre eine Flüssigkeit von gleicher Alkoholdampfspannung gebracht wurde. Dieses Verfahren hat sich in der Tat gut bewährt. Bringt man das vorher in Alkohol-Salzlösung narkotisierte Rückenmark in ein mit Sauerstoff gefülltes Gefäß, an dessen Boden sich etwas von der zur Narkose verwendeten Lösung befindet, so tritt auch im Verlaufe von Stunden keine Erholung ein, ja, es genügt sogar das vorher nicht narkotisierte Rückenmark in eine solche mit Alkoholdampf versetzte O-Atmosphäre zu bringen, um allmählich, allerdings sehr viel langsamer als beim Untertauchen in die Alkohol-Salzlösung, die Erregbarkeit zum Verschwinden zu bringen, die in einer alkoholfreien O-Atmosphäre dann wieder zurückkehrt. Auf diese Weise war auch

die Möglichkeit geboten, die etwaigen Veränderungen des O-Verbrauches während des allmählichen Eintritts der Narkose und während der Erholung von derselben zu untersuchen. Zur Narkose mit Alkohol wurde meist eine 5 bis 6 Vol.-%ige Lösung verwendet, zur Narkose mit Urethan eine solche, die 0,5 Gew.-% enthielt.

3. Der Einfluß der Narkose auf den O-Verbrauch unter gewöhnlichen Bedingungen.

A. Urethannarkose.

Die Versuche wurden mit der obigen Lösung angestellt. Kontrollversuche am Reflexpräparat ergaben, daß in einer solchen Lösung die Reflexerregbarkeit in 15 bis 30 Minuten völlig erlischt, um auch nach 1 bis 2stündigem Verweilen in der Lösung oder in einer O-Atmosphäre (in der, wie oben erwähnt, keine Erholung eintritt) bei Übertragung in gewöhnliche Salzlösung gut wiederzukehren. Die Versuche wurden entweder so angestellt, daß der O-Verbrauch des Rückenmarks zuerst in Ringer-Lösung und dann in mit Urethan versetzter Ringer-Lösung untersucht wurde, oder es wurde der O-Verbrauch zuerst in einer O-Atmosphäre bestimmt, dann das Rückenmark für eine zur völligen Aufhebung der Reflexerregbarkeit ausreichende Zeit in Urethanlösung gebracht, und hierauf wieder der O-Verbrauch in einer O-Atmosphäre gemessen. Am Schlusse des Versuchs wurde zur Prüfung der Reversibilität der Erscheinung das Rückenmark jedesmal wieder in das anfängliche Medium zurückgebracht, im letzteren Falle, nachdem es zuvor wieder für eine zur Herbeiführung der Erholung erfahrungsgemäß ausreichende Zeit in gewöhnliche Ringer-Lösung getaucht worden war. Die Resultate geben die folgenden Tabellen:

a) Einfluß der Urethannarkose auf den O-Verbrauch in Ringer-Lösung:

	O-Verbrauch in Ringer-Lösung pro Std. cmm	O-Verbrauch in Urethan-Ringer-Lösung pro Std. cmm	O-Verbrauch in Ringer-Lsg. nach d. Narkose pro Std. cmm	Differenz zwischen dem O-Verbrauch vor und während der Narkose
1	9,5	8,5	8,4	−1,0
2	8,8	8,0	9,0	−0,8
3	17,2	15,7	16,9	−1,5
4	22,3	19,0	20,0	−3,3

b) Einfluß der Urethannarkose auf den O-Verbrauch in O-Atmosphäre:

	O-Verbrauch pro Std. vor der Narkose cmm	O-Verbrauch pro Std. während der Narkose cmm	O-Verbrauch pro Std. nach der Erholung cmm	Differenz zwischen dem O-Verbrauch vor und während der Narkose
1	17,2	10,9	10,1	— 6,3
2	15,8	15,3	15,1	— 0,5
3	21,8	18,5	16,0	— 3,3
4	20,8	17,3	18,8	— 3,5
5	20,5	15,9	—	— 4,6
6	18,8	12,5	—	— 6,3

In den beiden letzten Versuchen wurde außer dem O-Verbrauch auch durch Fortlassen der zur Absorption der Kohlensäure dienenden Kalilauge die Größe des Überschusses der O_2-Aufnahme über die CO_2-Abgabe gemessen und hieraus die letztere, sowie der respiratorische Quotient berechnet; es war keine deutliche Beeinflussung desselben durch die Narkose feststellbar.

Wie alle Versuche übereinstimmend zeigen, ruft das Urethan in der zur Aufhebung der Reflexerregbarkeit ausreichenden Konzentration fast stets eine deutliche, in einzelnen Versuchen sogar eine recht beträchtliche Herabsetzung des O-Verbrauchs hervor. Aber die großen Schwankungen in der Beeinflussung, sowie der Umstand, daß nach Aufhebung der Narkose oft kein oder nur ein unvollständiger Rückgang des O-Verbrauchs zur Norm stattfindet, spricht jedenfalls sehr gegen die Annahme eines ursächlichen Zusammenhangs zwischen der Verminderung des Gaswechsels und der Aufhebung der Erregbarkeit.

B. Alkoholnarkose.

Die Kontrollversuche am Reflexpräparat ergaben, daß in einer 5 bis $6^0/_0$ igen Alkohol-Salzlösung das Rückenmark in meist 10 bis 25 Minuten seine Erregbarkeit einbüßt und sie in gewöhnlicher Salzlösung in ungefähr der gleichen Zeit wieder gewinnt. Wie in der Methodik auseinandergesetzt, bleibt das in Alkohollösung narkotisierte Rückenmark in einer O-Atmosphäre unerregbar, wenn man durch Einbringen von etwas Alkohollösung dafür sorgt, daß in der O-Atmosphäre die gleiche

Alkoholdampfspannung erhalten bleibt, erholt sich dagegen in einer von Alkoholdampf freien Atmosphäre. Ferner tritt in einer (durch Einbringen von etwas 5 bis 7 % Alkohollösung) mit Alkoholdampf versetzten Atmosphäre im Verlaufe von 3/4 bis 1 1/2 Stunden völliger Verlust der Erregbarkeit ein, die in einer alkoholdampffreien Atmosphäre in etwa 3/4 bis 1 1/4 Stunden zurückkehrt. Die Ergebnisse der Versuche über den Einfluß der durch Alkoholdampf, bzw. Alkohollösung erzeugten Narkose auf den O-Verbrauch geben die folgenden Tabellen.

a) Der Einfluß der Narkose durch Alkoholdampf auf den O-Verbrauch in einer O-Atmosphäre:

	O-Verbrauch pro Std. vor der Narkose cmm	O-Verbrauch in cmm pro Std. während der Narkose mit	O-Verbrauch pro Std. nach der Narkose cmm	Differenz zwischen dem O-Verbrauch vor und während der Narkose
1	13,6	5 % Alk. 15,3	12,6	+ 1,7
2	19,2	5 % „ 19,7	19,2	+ 0,5
3	19,0	10 % „ 19,9	20,5	+ 0,9
4a	17,9	5 % „ 16,9; 20,0	17,9	− 1,0; + 2,1
4b	17,9	5 % „ 19,8	18,3	+ 1,9
5a	12,1	7 % „ 16,4	13,5	+ 4,3
5b	13,5	5 % „ 14,3	14,2	+ 0,8
6a	13,7	7 % „ 15,6	13,6	+ 1,9
6b	13,6	10 % „ 15,6	14,2	+ 2,0

Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, ergeben alle Versuche übereinstimmend eine leichte Steigerung des O-Verbrauchs unter Einwirkung von Alkoholdampf in narkotischer Konzentration. Im dritten Stabe ist der Vol.-%-Gehalt der Lösung an Alkohol angegeben, die in das Atmungsfläschchen gebracht wurde, um die darüber befindliche Atmosphäre mit Alkoholdampf zu versetzen. Da, wie oben erwähnt, bei dieser Art der Alkoholeinwirkung die völlige Narkose erst im Verlaufe von etwa 3/4 bis 1 1/2 Stunden eintritt, so geben die Mittelwerte des Gaswechsels zum Teil den O-Verbrauch während der allmählichen Entwicklung der Narkose an. Aber wenn man von Versuch 4a absieht, in welchem in der 1. und 2. Stunde erheblich voneinander abweichende Werte gefunden wurden, die daher auch gesondert angeführt sind, zeigen die in 1/2 stündigen Intervallen vorgenommenen Ablesungen (2 bis 4 in jedem Narkoseversuch) keine Differenz, die auf eine allmähliche Änderung

des O-Verbrauchs hinweisen würde[1]); die Steigerung desselben kommt vielmehr gleich in der ersten Ablesung zum Ausdruck, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß die Messung des Gaswechsels erst etwa 20 Minuten nach Einwirkung des Narkoticums beginnt. In den Versuchen 4, 5 und 6 wurde die Einwirkung des Alkohols an demselben Rückenmark 2 mal hintereinander untersucht. In Versuch 2 und 3 wurde in der früher angegebenen Weise der respiratorische Quotient berechnet; auch hier war keine deutliche Beeinflussung desselben durch die Narkose feststellbar.

In den im folgenden zusammengestellten Versuchen wurde das Rückenmark nach Untersuchung des Gaswechsels unter normalen Bedingungen zuerst auf 24 bis 30 Minuten in 5 bis 6%ige Alkohollösung eingetaucht, um eine völlige Narkose herbeizuführen, und erst dann der O-Verbrauch unter der Einwirkung von Alkoholdampf von entsprechender Konzentration untersucht, in Versuch 8 2 mal nacheinander. Auch bei diesem Verfahren war das Resultat das gleiche, mit Ausnahme von Versuch 8a, in welchem eine Verminderung des O-Verbrauchs um 0,9 cmm pro Stunde beobachtet wurde; doch fallen Differenzen bis zu 1 cmm pro Stunde in das Bereich der Fehlerquellen, bzw. der auch unter normalen Bedingungen zu beobachtenden Schwankungen.

	O-Verbrauch pro Std. vor der Narkose cmm	O-Verbrauch in cmm pro Std. während der Narkose mit		O-Verbrauch pro Std. nach der Narkose cmm	Differenz zwischen dem O-Verbrauch vor und während der Narkose
8a	11,7	6% Alk.	10,8	10,1	−0,9
8b	10,1	5% „	12,3	10,1	+2,2
9	10,3	5% „	11,8	—	+1,5
10	13,1	6% „	14,6	14,1	+1,5

b) Einfluß der Narkose auf den O-Verbrauch in Salzlösung:
(Tabelle s. nächste Seite.)

Versuch 2 und 3 sind mit Ringer-Lösung, alle übrigen mit 0,7%iger NaCl-Lösung angestellt; in Versuch 3 wurde der Einfluß der Narkose wieder 2 mal an demselben Rückenmark untersucht. Die Resultate dieser Versuche stimmen mit jenen

[1]) Zwei Versuche mit unregelmäßigen Schwankungen des O-Verbrauchs sind als möglicherweise mit Fehlerquellen behaftet nicht mitberücksichtigt.

über die Einwirkung von Alkoholdampf völlig überein. Bis hinauf zu einer Konzentration von 8%, die doppelt so stark ist als die zur Erzielung einer völligen Narkose eben ausreichende, läßt der Alkohol den O-Verbrauch entweder unverändert oder er ruft eine Steigerung desselben hervor, die mitunter 20 bis 30% des Normalwertes betragen kann. Erst in einer Konzentration von 10% ist eine oxydationshemmende Wirkung des Alkohols feststellbar. Auffällig ist die in etwa der Hälfte der Fälle beobachtete Herabsetzung des O-Verbrauchs nach der Erholung unter den Anfangswert.

	O-Verbrauch pro Std. vor der Narkose cmm	O-Verbrauch in cmm pro Std. während der Narkose mit	O-Verbrauch pro Std. nach der Narkose cmm	Differenz zwischen dem O-Verbrauch vor und während der Narkose
1	14,0	4% Alk. 14,3	12,6	+0,3
2	12,0	5% „ 13,2	10,9	+1,2
3a	10,3	5% „ 12,5	9,2	+2,2
3b	9,2	5% „ 11,5	7,2	+2,3
4	12,8	5% „ 13,0	12,4	+0,2
5	22,9	6% „ 23,3	24,3	+0,4
6	11,8	6% „ 15,9	14,4	+4,1
7	12,0	8% „ 12,1	—	+0,1
8	15,1	10% „ 13,5	13,1	−2,6
9	16,6	10% „ 15,5	—	−1,1

Die Gesamtheit dieser Versuche über die Einwirkung des Alkohols führen somit zu dem bemerkenswerten Ergebnis, daß dieser in einer zur völligen Aufhebung der Reflexerregbarkeit ausreichenden Konzentration keine Herabsetzung, sondern meist eine deutliche Steigerung des O-Verbrauchs herbeiführt. Diese Tatsache offenbart auf das klarste die weitgehende Unabhängigkeit, die zwischen der Erregbarkeit und dem Ablauf der Oxydationsprozesse im Zentralnervensystem besteht, und entzieht einer jeden Theorie den Boden, die die Narkose auf eine wie immer geartete Behinderung der Sauerstoffatmung zurückzuführen sucht.

4. Der Einfluß der Narkose auf den O-Verbrauch nach vorangegangener Erstickung.

Die eben mitgeteilten Beobachtungen über den Einfluß der Alkoholnarkose auf den Gaswechsel des Froschrückenmarks

stehen in auffälligem Gegensatz zu der von mir[1]) festgestellten Tatsache, daß die durch O-Mangel gelähmten Nervenzentren des Frosches den in der Narkose (z. B. bei Durchspülung mit 5 % Alkohol enthaltendem Blut) ihnen dargebotenen Sauerstoff nicht zu ihrer Erholung zu verwenden vermögen, eine Tatsache, die kaum anders als durch eine Behinderung der Oxydationsprozesse erklärbar schien. Da nun die vorangehenden Versuche immerhin noch die — freilich wenig wahrscheinliche — Möglichkeit offen ließen, daß durch O-Mangel ein Zustand herbeigeführt werde, in welchem die Narkose die O-Aufnahme behindert, so wurden noch einige Versuche angestellt, in denen der Einfluß der Alkoholnarkose auf den Sauerstoffverbrauch des Rückenmarks nach vorangegangener Erstickung untersucht wurde. Zu diesem Zwecke mußte zuerst in Vorversuchen der Einfluß festgestellt werden, den eine vorangehende O-Entziehung für sich allein auf den O-Verbrauch ausübt. Die früheren Versuche zur Frage der O-Speicherung[2]) hatten ergeben, daß die Größe des „O_2-Überschusses" (Überschuß der O_2-Aufnahme über die CO_2-Abgabe) nach vorangegangener Erstickung keine Zunahme erfährt[3]). Die in der folgenden Tabelle zusammen-

[1]) H. Winterstein, Zur Kenntnis der Narkose. Zeitschr. f. allg. Physiol. 1, 19, 1902.

[2]) H. Winterstein, Über den Mechanismus der Gewebsatmung. Zeitschr. f. allg. Physiol. 6, 314, 1907.

[3]) In seiner neuesten Schrift (Erregung und Lähmung. G. Fischer, Jena 1914, S. 97) gibt Verworn eine Kritik dieser Versuche, die ich hier bloß für jene erwähne, die (ebenso wie anscheinend Verworn) meine Arbeit nicht kennen. Zur Rettung der für seine Theorien unentbehrlichen O-Depots nimmt Verworn an, daß das Rückenmark vielleicht „stark geschädigt oder sogar vollkommen abgestorben" sein und sich bei der O-Zufuhr vielleicht nur unvollkommen oder überhaupt nicht erholt haben konnte. Wer meine Arbeit gelesen hat, weiß, daß durch zahlreiche Kontrollversuche (l. c., S. 333 bis 336, S. 351 bis 354) eine solche Möglichkeit vollkommen ausgeschlossen wurde. Denn die Annahme, daß das Rückenmark im Atmungsapparat unter genau den gleichen Bedingungen jedesmal abgestorben sein soll, unter denen es sich in einem anderen Gefäß regelmäßig erholte, solange es durch den Nerven mit einem Bein in Verbindung stand, wäre wohl zu absurd, als daß sie dieser Kritik zugrunde liegen könnte. — Die an der gleichen Stelle von Verworn zitierte Kritik von Lesser würde höchstens gerade den umgekehrten Fall treffen, nämlich wenn ich aus einer beobachteten Steigerung des O-Überschusses das Vorhandensein einer O-Speicherung

gestellten Versuche zeigen, daß der O-Verbrauch nach vorangegangener O-Entziehung stets eine sehr bedeutende Herabsetzung zeigt. Die Versuche wurden zum Teil mit gereinigtem, O-freiem Stickstoff ausgeführt, zum Teil mit Stickstoff, der ca. $1^1/_2$ % O enthielt. Kontrollversuche ergaben, daß dieser geringe O-Gehalt auf die Erstickung keinen nennenswerten Einfluß ausübt, wie dies auch schon ältere Versuche (l. c.) erwiesen hatten.

	O-Verbrauch pro Std. vor der Erstickung cmm	Dauer der Erstickung Minuten	O-Verbrauch pro Std. nach der Erstickung cmm	Differenz zwischem dem O-Verbrauch vor und nach der Erstickung
1	12,1	60	7,4	−4,7
2	15,0	48	10,1	−4,9
3	11,3	60	5,8	−5,5
4	13,8	108	9,6	−4,2

Die drei ersten Versuche sind in gasförmigem Medium angestellt, der letzte in 0,7 %iger NaCl-Lösung.

Um nun den Einfluß der Alkoholnarkose auf den O-Verbrauch nach vorangegangener Erstickung zu untersuchen, wurde folgendermaßen verfahren: Da wir durch die Untersuchungen von Bondy[1]) wissen, daß die Nervenzentren in der Narkose ebenso rasch ersticken wie ohne eine solche, wurde nach Feststellung des O-Verbrauchs unter normalen Bedingungen in das Atmungsfläschchen etwa 6 % Alkohol enthaltende NaCl-Lösung gebracht und hierauf der Sauerstoff durch Stickstoff verdrängt. Nach längerem Aufenthalt in diesem wurde der Stickstoff wieder durch Sauerstoff ersetzt und der O-Verbrauch des Rückenmarks neuerdings bestimmt. Dann wurde die Alkohol-NaCl-Lösung durch gewöhnliche ersetzt, um den O-Verbrauch nach Beseitigung der Narkose festzustellen. Wenn durch die Narkose die O-Atmung des erstickten Rückenmarks irgendwie beeinträchtigt wurde, so mußte der O-Verbrauch unter der

gefolgert hätte (!). Daß eine solche Folgerung nicht zutreffend zu sein braucht, weil der gleiche Effekt auch durch eine Oxydation angesammelter Erstickungsstoffe erzielt werden könnte, habe ich selbst bereits in der gleichen Arbeit (S. 374 bis 376) ausführlich dargelegt.

[1]) O. Bondy, Untersuchungen über die Sauerstoffaufspeicherung in den Nervenzentren. Zeitschr. f. allg. Physiol. 3, 180, 1904.

Einwirkung der Alkoholnarkose geringer sein als nach Aufhebung derselben. Die Resultate gibt die folgende Tabelle. Die beiden ersten Versuche sind in gasförmigem Medium (Narkose durch Alkoholdampf), die beiden letzten in NaCl-Lösung ausgeführt.

	O-Verbrauch pro Std. vor der Erstickung	Dauer der Erstickung	O-Verbrauch in cmm nach der Erstickung		Differenz zwischen dem O-Verbrauch in Narkose u. ohne Narkose
	cmm	Min.	in Narkose	ohne Narkose	
1	14,4	60	10,0	9,9	+ 0,1
2	14,4	106	9,6	7,0	+ 2,6
3	11,7	90	12,8	10,4	+ 2,4
4	15,0	120	7,8	7,2	+ 0,6

Die Versuche zeigen übereinstimmend, daß von einer Behinderung der O-Atmung durch die Narkose auch nach vorangegangener O-Entziehung keine Rede sein kann. Zwar ist der O-Verbrauch nach der Erstickung, wie dies ja auf Grund der Vorversuche zu erwarten war, herabgesetzt (mit Ausnahme von Versuch 3), aber diese Herabsetzung ist unter dem Einfluß der Narkose nicht stärker, sondern im Gegenteil geringer als nach Aufhebung derselben, so daß die oxydationssteigernde Wirkung der Alkoholnarkose auch hier wieder zum Ausdruck kommt.

Obwohl also die erstickten Nervenzentren sich bei O-Zufuhr in Narkose nicht zu erholen vermögen, ist die früher gezogene Schlußfolgerung, daß dies auf einer Behinderung der Oxydationsprozesse beruhe, irrig. Der Versuch einer Erklärung dieser Erscheinung soll später gegeben werden; hier sei nur nochmals auf die durch diese Beobachtungen illustrierte Tatsache hingewiesen, daß alle anscheinend noch so zwingenden Schlüsse, die aus dem Verhalten der Erregbarkeit auf die ihnen zugrunde liegenden Stoffwechselvorgänge gezogen werden, durchaus unzuverlässig sind und nur direkte Untersuchungen dieser Vorgänge sichere Aufschlüsse zu geben vermögen.

5. Der Einfluß der Narkose auf den O-Verbrauch bei Reizung.

Heaton[1]) hat beobachtet, daß auch beim narkotisierten Nerven die elektrische Reizung trotz ihrer Erfolglosigkeit eine

[1]) T. B. Heaton, Zur Kenntnis der Narkose. Zeitschr. f. allg. Physiol. 10, 53, 1910.

deutliche Abkürzung der Erstickungszeit hervorruft, und hat daraus geschlossen, daß die dissimilatorische Stoffwechselphase auch während der Narkose durch erregende Reize noch gesteigert werden kann. Wenn diese Annahme beim Rückenmark zuträfe, so wäre, da ja eine Behinderung der O-Atmung nicht stattfindet, zu erwarten, daß die Reizung des Rückenmarks auch in der Narkose bei völliger Aufhebung der Erregbarkeit eine Steigerung des Gaswechsels herbeiführt, wie dies nach meinen früheren Untersuchungen[1]) im normalen Zustande der Fall ist.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde ein Respirationsapparat verwendet, bei dem in das Atmungsfläschchen Platinelektroden eingeschmolzen waren, die innerhalb des Wasserbades durch Gummischläuche gegen das Wasser isoliert waren. Sie mündeten in dem Fläschchen in die Flüssigkeit ein, in der das Rückenmark suspendiert war. Kontrollversuche am Reflexpräparat dienten zur Feststellung der unter diesen Bedingungen zur Reizung erforderlichen Stromstärke. Zur Untersuchung des Einflusses der Reizung wurde der O-Verbrauch in einer halbstündigen Ruheperiode mit dem einer halbstündigen Reizungsperiode verglichen, während welcher dem Rückenmark durch ein in den primären Kreis eines Induktionsapparates eingeschaltetes Metronom etwa 30 bis 40 kurze tetanisierende Reize zugeführt wurden. Die folgende Tabelle zeigt die mit Alkoholnarkose (in Versuch 1 bis 4 6 $^0/_0$ Alk., Versuch 5 5 $^0/_0$ Alk.) gewonnenen Ergebnisse:

		O-Verbrauch pro 30 Min. in der Ruhe cmm	O-Verbrauch pro 30 Min. bei der Reizung cmm	O-Verbrauch pro 30 Min. nach der Reizung cmm	Differenz zwischen dem O-Verbrauch in der Ruhe und bei Reizung
1	Normal . . .	5,6	6,8	6,0	+ 1,2
	Narkotisiert .	7,7	6,8	6,1	− 0,9
2	Normal . . .	4,0 (?)	8,0	6,0	+ 4,0 (?)
	Narkotisiert .	7,0	7,1	6,5	+ 0,1
3	Normal . . .	9,4	11,0	9,6	+ 1,6
	Narkotisiert .	7,2	6,6	6,6	− 0,6
4	Narkotisiert .	6,1	5,6	6,1	− 0,5
	Normal . . .	6,3	9,0	6,0	+ 2,7
5	Narkotisiert .	6,5	6,8	6,9	+ 0,3
	Normal . . .	7,2	8,4	7,3	+ 1,2

[1]) H. Winterstein, Der respiratorische Gaswechsel des isolierten Froschrückenmarks. Centralbl. f. Physiol. **21**, 869, 1908.

In den ersten Versuchen wurde der Einfluß der Reizung zuerst am normalen und dann am narkotisierten Rückenmark untersucht; da der Einwand erhoben werden konnte, daß das Präparat vielleicht durch die Reizung in einen Zustand versetzt wurde, in dem eine zweite Reizung keine Steigerung des O-Verbrauchs mehr hervorzurufen vermochte, so wurden die beiden letzten Versuche so angestellt, daß der Einfluß der Reizung zuerst am narkotisierten und dann am normalen Rückenmark untersucht wurde. Der Erfolg war aber in allen Versuchen der gleiche. Eine Reizung, die am nicht narkotisierten Rückenmark eine Steigerung des O-Verbrauchs um 17 bis 50% hervorruft, läßt den O-Verbrauch in Alkoholnarkose gänzlich unbeeinflußt.

Etwas andere Resultate ergaben analoge Versuche mit Urethannarkose. Es wurde zunächst Urethan in der schon bei den früheren Versuchen angewendeten Konzentration (0,5 Gew.-%) benutzt, die, wie die Kontrollversuche am Reflexpräparat ergaben, eine völlige Aufhebung der Reflexerregbarkeit innerhalb kurzer Zeit bewirkt. Aber sowohl bei dieser wie bei der doppelten, ja selbst bei einer vierfach so starken Konzentration des Narkoticums rief die Reizung bei geringem Rollenabstand noch eine deutliche Steigerung des O-Verbrauchs hervor. Als nun aber Kontrollversuche unter den gleichen Bedingungen am Reflexpräparat angestellt wurden, ergab sich, daß das durch die angegebenen Urethankonzentrationen narkotisierte Rückenmark trotz völliger Aufhebung der Reflexerregbarkeit durch den elektrischen Strom von der gleichen Reizstärke noch direkt erregbar war, im Gegensatze zur Alkoholnarkose, die am Reflexpräparat eine gänzliche Aufhebung auch der direkten Reizbarkeit bis zur Stromschleifengrenze herbeiführte. Ein Versuch mit geringerer, am normalen Rückenmark gut wirksamer, bei Urethannarkose dagegen wirkungsloser Reizstärke rief denn auch keine Steigerung des O-Verbrauchs mehr hervor.

Diese Versuche ergeben als interessanten Nebenbefund, daß die Urethannarkose die Erregbarkeit der motorischen Mechanismen (oder vielleicht der Nervenfasern der weißen Substanz) viel schwächer beeinflußt als die der sensiblen, und legen wohl besonders überzeugend klar, daß in der Narkose die Reizung nur insoweit eine Steigerung des Gaswechsels

herbeiführt, als auch noch eine Erregbarkeit vorhanden ist. Bedenkt man, daß Reize, die zu schwach sind, um eine Reaktion auszulösen, dennoch, wie ja besonders die Erscheinungen der Summation einzeln unwirksamer Reize lehren, einen Erregungsvorgang verursachen können, so erklären sich die Befunde von Heaton wohl in einfachster Weise durch die Annahme, daß durch die Reizung des Nerven eine Erregung herbeigeführt wurde, die aber infolge des durch die Narkose verursachten Dekrements zu schwach war, um eine Reaktion des Muskels auslösen zu können.

6. Erörterung der Ergebnisse.

Die im vorangehenden mitgeteilten Versuche haben ergeben, daß die Narkose der Nervenzentren des Frosches in keinem Zusammenhange mit einer Behinderung der O-Atmung steht. Wo eine solche überhaupt vorhanden ist, stellt sie offenbar einfach eine Teil- oder Folgeerscheinung der Narkose dar, aber nicht ihre Ursache. Ja, der Alkohol ruft in einer Konzentration, die die zur Narkose erforderliche noch beträchtlich übersteigen kann, keinerlei Herabsetzung, sondern sogar eine Steigerung des O-Verbrauchs hervor, sowohl unter gewöhnlichen Bedingungen wie auch nach vorangegangener Erstickung. Es bleibt nun die merkwürdige Tatsache aufzuklären, warum trotz ungestörten, ja sogar gesteigerten Ablaufes der Oxydationsprozesse, dennoch, wie früher erwähnt, die erstickten Nervenzentren sich nicht erholen können, wenn die O-Zufuhr in Narkose erfolgt. Ja, nach Heaton (l. c.) würde nicht bloß, wie dies Fröhlich gezeigt hatte, der erstickte Nerv sich in Narkose trotz O-Zufuhr nicht erholen können, sondern es würde sogar während der Narkose in Luft, also bei dauernder Anwesenheit von Sauerstoff, der Nerv allmählich „ersticken“, d. h. in einen Zustand geraten, aus dem eine Erholung nach Aufhebung der Narkose nur bei Anwesenheit von Sauerstoff, nicht aber in einer O-freien Atmosphäre erfolgen kann.

Wie schon in der I. Mitteilung (S. 147) erwähnt, hat Bondy (l. c.) einen Versuch ausgeführt, der kein derartiges Verhalten für die Nervenzentren erweisen würde. Er durchspülte einen Frosch mit alkoholhaltigem Blut während einer erfahrungsgemäß zur Herbeiführung der Erstickung ausreichenden

Zeit und fand, daß nach Aufhebung der Narkose die Erregbarkeit bei Durchspülung mit einer O-freien NaCl-Lösung prompt zurückkehrte. Ich habe jedoch mit dem Reflexpräparat des isolierten Rückenmarks einige Versuche angestellt, die mir dafür zu sprechen scheinen, daß ähnliche Verhältnisse, wie sie Heaton am Nerven beobachtet hat, auch bei den Nervenzentren vorliegen. Das Rückenmark verliert in 0,7 % NaCl-Lösung bei Durchleitung von Stickstoff (der ca. $1^1/_2$ % O enthält) seine Reflexerregbarkeit in etwa $1^1/_2$ bis $1^3/_4$ Stunden. Ich habe nun das Rückenmark von Reflexpräparaten für $^1/_2$ bis $1^1/_2$ Stunden in 5 % Alkohol-NaCl-Lösung getaucht, bei ständiger Durchleitung von Sauerstoff, und beobachtet, ob nach dieser Narkose die Erstickungszeit in O-freier Lösung eine Abkürzung erfährt. In zwei Versuchen, in denen die Narkose nach völligem Verschwinden der Reflexerregbarkeit 10, bzw. 30 Minuten gedauert hatte, war kein deutlicher Einfluß feststellbar, in drei Versuchen mit 35, 40 und 80 Minuten dauernder völliger Narkose aber war die Erholung in O-freier Lösung nur schwach und der Verlust der Erregbarkeit durch Erstickung erfolgte bereits in 30 bis 45 Minuten, und in einem Versuche mit 75 Minuten dauernder Narkose trat in der O-freien Lösung im Verlaufe von 70 Minuten überhaupt keine Erholung ein, während dies nach O-Zufuhr der Fall war. Ebenso war in drei Versuchen mit 30 bis 60 Minuten dauernder Urethannarkose in der O-freien Lösung keine Erholung zu erzielen, sondern erst nach O-Zufuhr.

Diese Versuche weisen darauf hin, daß anscheinend auch die Nervenzentren während der Narkose trotz O-Zufuhr allmählich in einen Zustand geraten, der nur in Anwesenheit von Sauerstoff wieder behoben werden kann[1]). Da nun die früher

[1]) W. Storm van Leeuwen (Quantitative pharmakologische Untersuchungen über die Reflexfunktionen des Rückenmarks an Warmblütern, I. Mitteil, Arch. f. d. ges. Physiol. **154**, 307, 1913) hat gegen meine Ausführungen in der I. Mitteil. (S. 148) polemisiert, nach denen die Narkose durch die hinzukommende Erstickung allmählich eine Verstärkung erfahren müsse. Es sei nicht einzusehen, warum die durch die Narkose bewirkte Behinderung der Stoffwechselvorgänge sich nicht auf ein konstantes Niveau einstellen könne, wie dies nach den Versuchen des Verfassers über das Konstantbleiben der Reflexerregbarkeit bei gleichbleibender Narkosekonzentration tatsächlich der Fall wäre. Der Verfasser

gemachte Annahme, die alle diese Erscheinungen in einfacher Weise durch eine Behinderung der Oxydationsvorgänge zu erklären suchte[1]), sich als irrig erwiesen hat, so müssen wir schließen, daß zwischen den Oxydationsprozessen und den der Erregbarkeit und der Erregung zugrunde liegenden Vorgängen noch andere zwischengeschaltet sind, die durch die Narkose beeinflußt werden. Diese beiden Arten von Vorgängen stehen insofern in engem Zu-

---

hat übersehen, daß meine Schlußfolgerung nicht einfach auf die Behinderung der Oxydationsprozesse, oder, wie ich jetzt sagen möchte, der „Nutzbarmachung" derselben, sondern eben auf die ungleichmäßige Beeinflussung dieser und der den „O-Bedarf" bedingenden Vorgänge gegründet war, wie sie aus den Versuchen von Heaton und anderen resultierte und auch aus diesen neuen Beobachtungen sich zu ergeben scheint. Inwieweit diese Verhältnisse allgemeine Gültigkeit besitzen, kann nur experimentell entschieden werden.

[1]) Es muß hier übrigens darauf hingewiesen werden, daß bei einiger Überlegung die Erstickungstheorie der Narkose auch unter Voraussetzung einer Behinderung der Oxydationsprozesse angesichts dieser Beobachtungen in unlösliche Widersprüche verwickelt wird, was seltsamerweise Verworn bei seinen auf S. 278 seiner neuen Schrift (Erregung und Lähmung, G. Fischer, Jena 1914) angestellten Betrachtungen ganz entgangen zu sein scheint: Wenn Nerven und Nervenzentren nach Entziehung von Sauerstoff noch eine Zeitlang erregbar bleiben, so ist dies nur möglich entweder auf Kosten von Reservesauerstoff oder auf Kosten anoxybiotischer Vorgänge. Die letztere Annahme würde die Erstickungstheorie der Narkose ohne weiteres hinfällig machen, weil ja dann der plötzliche Eintritt der Unerregbarkeit bei Narkose nicht durch eine Behinderung der Oxydationsprozesse erklärbar wäre. Die Annahme eines Reservesauerstoffs ist also, wie auch Verworn zugibt, die unumgängliche Voraussetzung seiner Theorie. Wenn man aber das Vorhandensein eines solchen Reservesauerstoffs annimmt, dann ist wieder absolut unverständlich, wieso nach den Versuchen von Heaton (und den oben angeführten) das Nervensystem bei andauernder O-Zufuhr während der Narkose in derselben Zeit wie bei einfacher O-Entziehung in einen Zustand von Erstickung geraten kann, der nur bei Zufuhr von äußerem Sauerstoff wieder zu beheben ist. Denn wenn die Narkose die O-Atmung verhindert, dann ist ja nicht einzusehen, warum nicht auch nach stundenlanger Narkose der Reservesauerstoff noch vorhanden ist und nach Aufhören der Narkose die Rückkehr der Erregbarkeit gestattet. Man müßte dann schon annehmen, daß dieser Reservesauerstoff während der Narkose doch aufgebraucht wurde, und zwar ebenso rasch wie ohne Narkose, woraus sich wieder ergeben würde, daß die Narkose die O-Atmung gar nicht behindert hat (!).

sammenhange, als das dauernde Erhaltenbleiben der Erregbarkeit des Nervensystems an den Fortgang der Oxydationsprozesse geknüpft ist, und umgekehrt diese durch die bei Reizung auftretenden Erregungen eine Steigerung erfahren. Im übrigen aber besteht eine weitgehende Unabhängigkeit beider, da die Erregbarkeit auch bei O-Entziehung noch eine Zeitlang fortbesteht, und andererseits bei völliger Aufhebung der Erregbarkeit durch Narkose oder (wie die in der folgenden Arbeit von Unger mitgeteilten Versuche zeigen werden) andere Mittel, die Oxydationsprozesse in normalem oder sogar gesteigertem Ausmaße weitergehen können.

Wenn ich im folgenden den Versuch einer Erklärung dieser Tatsachen unternehme, so soll damit keine Theorie aufgestellt, sondern nur vorläufig eine Denkmöglichkeit erörtert werden. Ich glaube, daß ein jeder Erklärungsversuch ausgehen muß von dem bisher wenig beachteten Problem des „Ruhestoffwechsels" überhaupt. Während unsere Maschinen eine Energiezufuhr bloß benötigen, wenn sie Arbeit leisten sollen, und im Ruhezustand ohne jeden Schaden völlig „stillstehen" können, ist dies bekanntlich bei den Organismenmaschinen — von den seltenen Fällen des „latenten Lebens" abgesehen — nicht der Fall. In allen Geweben spielen sich auch im Zustande vollständigster Ruhe dauernd Energieumwandlungen, insbesondere Oxydationsprozesse, ab, deren Bedeutung völlig unbekannt, ja bisher überhaupt kaum erörtert wurde[1]), deren Unentbehrlichkeit für den Fortbestand des „Lebens" aber keinem Zweifel unterliegt, da ihre Behinderung meist rasch zu einer bald irreversiblen Störung der Funktionsfähigkeit führt. Die einfachste Deutung dieses eigenartigen Verhaltens dürfte die Annahme bieten, daß die Funktionsfähigkeit, „Erregbarkeit", geknüpft ist an einen dynamischen Gleichgewichtszustand chemischer oder physikalischer Natur, zu dessen Aufrechterhaltung eine ständige Zufuhr von Energie erforderlich ist, wie sie durch den Ruhestoffwechsel geliefert wird.

---

[1]) Neuerdings ist dieses Problem von O. Warburg (Untersuchungen über die Oxydationsprozesse in Zellen. II. Münch. med. Wochenschr. 2, 59. Jahrg., 2550, 1912, und Beiträge zur Physiologie der Zelle usw. Ergebn. d. Physiol. 1914, 14. Jahrg., 259) gestreift und von O. Meyerhof (Zur Energetik der Zellvorgänge. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1913) eingehender erörtert worden.

Dieser Gleichgewichtszustand könnte durch chemische Prozesse, durch Diffusions- oder sonstige Vorgänge ständig von selbst gestört und durch den Ruhestoffwechsel, in erster Linie durch die Oxydationsprozesse, immer wieder hergestellt werden. Nimmt man nun an, daß die Narkotica durch Veränderung der Permeabilität oder der Löslichkeitsverhältnisse oder dergl. eine derartige Veränderung herbeiführen, daß diese Wiederherstellung unmöglich wird, so kann man zu einer Vorstellung von den eigenartigen Beziehungen gelangen, die zwischen Narkose und Erstickung zu bestehen scheinen: Nach Stillstand der Oxydationsprozesse durch Entziehung des Sauerstoffs tritt eine allmähliche Gleichgewichtsstörung ein, die zu einer fortschreitenden Verminderung und schließlich einem Verlust der Erregbarkeit, einer „Erstickung", führt, die durch rechtzeitige O-Zufuhr wieder behoben werden kann. Erfolgt diese O-Zufuhr aber während der Narkose, so können zwar die Oxydationsprozesse vor sich gehen, nicht aber die Wiederherstellung des Gleichgewichtszustandes, der „Erregbarkeit" der Zelle, die daher weiter im „erstickten" Zustande verharrt. Macht man weiter die Annahme, daß die allmähliche Gleichgewichtsstörung auch während der Narkose vor sich geht, so wäre damit nicht bloß die Tatsache erklärt, daß auch in der Narkose bei O-Entziehung eine Erstickung eintritt, sondern auch die Erscheinung, daß eine Zelle in der Narkose trotz dauernder O-Zufuhr allmählich in einen Zustand von „Erstickung" geraten kann, da eben die Wiederherstellung des in immer wachsendem Maße gestörten Gleichgewichtszustandes in der Narkose nicht zu erfolgen vermag.

Zusammenfassung.

1. In einer zur völligen Aufhebung der Erregbarkeit ausreichenden Konzentration ruft Urethan eine beträchtliche Herabsetzung, Alkohol dagegen eine Steigerung des O-Verbrauchs des isolierten Froschrückenmarks hervor. Daraus ergibt sich, daß Erregbarkeit und Oxydationsgeschwindigkeit weitgehend voneinander unabhängig sind, und daß eine Verminderung der letzteren durch Narkotica, wo sie überhaupt stattfindet, eine sekundäre Erscheinung darstellt, die mit dem Mechanismus der Narkose in keinem Zusammenhange steht.

2. Auch nach vorangegangener Erstickung veranlaßt die Alkoholnarkose keine Behinderung der O-Atmung.

3. In völliger Narkose ruft elektrische Reizung des Rückenmarks keine Steigerung der Oxydationsprozesse hervor; eine solche erfolgt nur insoweit, als die Erregbarkeit erhalten ist.

4. Die einander scheinbar widersprechenden Tatsachen, daß die Alkoholnarkose keine Behinderung der Oxydationsprozesse herbeiführt und trotzdem erstickte Nervenzentren sich während der Alkoholnarkose bei O-Zufuhr nicht zu erholen vermögen, ja, wie aus einigen Versuchen hervorzugehen scheint, sogar bei andauernder O-Zufuhr allmählich in einen Zustand von „Erstickung" geraten, beweisen, daß zwischen den Oxydationsprozessen und den der Erregbarkeit und der Erregung zugrunde liegenden Vorgängen noch andere zwischengeschaltet sind, die durch die Narkose beeinflußt werden.

Untersuchungen über den Einfluß von anorganischen Lösungen auf die Oxydationsprozesse und die Reflexerregbarkeit des isolierten Froschrückenmarks.

Von

Rudolf Unger.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 4. März 1914.)

I. Einleitung.

Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen hatten die Aufgabe, den Einfluß der drei Salze der Frosch-Ringer-Lösung: NaCl, $CaCl_2$ und KCl, in verschiedener Konzentration auf die Oxydationsprozesse und auf die Reflexerregbarkeit des isolierten Froschrückenmarkes zu untersuchen.

Bekanntlich werden die verschiedenen Lebenserscheinungen durch die einzelnen Ionen sowie durch ihr Zusammenwirken in vielfacher Hinsicht beeinflußt. So hat in gleichzeitig erscheinenden Untersuchungen Gerlach, der auch eine Übersicht über die wichtigste diesen Gegenstand betreffende Literatur gibt, den Einfluß verschiedener Ionen auf die Lebensdauer des Zentralnervensystems künstlich durchspülter Säugetiere untersucht, und dabei gefunden, daß von den anorganischen Lösungen eine kalifreie, isotonische NaCl-Lösung, die ca. 0,05% $CaCl_2$ enthält, die für die Erhaltung der Erregbarkeit am besten geeignete ist.

Es erschien daher von großem Interesse zu untersuchen, wie sich an ein und demselben Objekt einerseits die Erregbarkeit und andererseits die Oxydationsprozesse, die man bisher vielfach als in engstem Zusammenhange miteinander stehend zu betrachten geneigt ist, gegenüber dem Einfluß verschiedener Salzlösungen verhalten.

II. Methodik.

Das Reflexpräparat wurde nach den Angaben von Winterstein[1]) hergestellt und stets darauf geachtet, auch nur das Rückenmark selbst, nicht aber den Nerven in die zu untersuchende Lösung zu tauchen. Nach leichtem Abspülen der noch anhaftenden Blut- und Kalkreste kam es vor und nach der Untersuchung in der fraglichen Salzlösung in 0,7% NaCl und blieb darin nach der Herausnahme aus dem Wirbelkanal noch $^1/_2$ bis 1 Stunde. Es tritt nämlich fast ausnahmslos trotz sorgfältigster und schonendster Präparation infolge der schweren Eingriffe am Rückenmark eine Art Chokwirkung auf. Jede etwas unvorsichtige Berührung bei Eröffnung des Wirbelkanals wird sofort mit krampfartigen Zuckungen der Extremitäten- und Rumpfmuskulatur beantwortet. Obwohl sich dieser Fehler vermeiden läßt, sind doch das Abziehen der Dura mater mit ihren feinen sensiblen Nervenästen und schließlich die Durchschneidung der vordern und hintern Wurzeln aller Spinalnerven nicht zu umgehen. All diese Faktoren zusammen bewirken, daß das fertige Präparat erst nach einiger Zeit seine normale Reflexerregbarkeit wieder erlangt. Dies tritt oft schon nach wenigen Minuten ein, nach Ablauf einer halben Stunde etwa ist aber jedes brauchbare Präparat sehr gut erregbar und reagiert auf leichtes Kneifen der Zehen mit heftigen Abwehrbewegungen.

Zur Feststellung des Sauerstoffverbrauches in den verschiedenen Salzlösungen wurde das isolierte Rückenmark im Wintersteinschen Mikrorespirationsapparat[2]) untersucht.[3]) Es kam, in seiner Gänze oder in 2 bis 3 Teile zerschnitten, in 0,4 bis 0,8 ccm der zu untersuchenden Lösung; in die am Stopfen befindlichen Glasschälchen wurde 3% Kalilauge zur Absorption der gebildeten Kohlensäure gebracht. Dann wurde durch das Untersuchungs- und Kompensationsgefäß etwa 45 Sek.

---

[1]) H. Winterstein, Über den Mechan. d. Gewebsatmung. Zeitschr. f. allgem. Physiol. 6, 315, 1907.

[2]) H. Winterstein, Ein Apparat zur Mikroblutgasanalyse u. Mikrorespirometrie. Diese Zeitschr. 46, 440, 1912; Derselbe, Ein Mikrorespirationsapparat. Zeitschr. f. biolog. Techn. u. Method. 3, 246, 1913.

[3]) Bezüglich der Literatur über den Gaswechsel des Froschrückenmarks sei auf die vorangehende Arbeit von Winterstein (Beiträge zur Kenntnis der Narkose. II. Mitteil.) verwiesen.

lang ein starker Sauerstoffstrom geleitet und der ganze Apparat im Wasserbade bei einer Temperatur von meist 18 bis 20° C, die während der Versuchsdauer nur wenig variierte, durch das Rührwerk in beständiger, langsamer Bewegung gehalten. Nach etwa 20 bis 30 Min., wenn ein vollkommener Ausgleich der Temperatur und des Gasdrucks in allen Teilen eingetreten ist, wurde in Abständen von 30 Min. der verbrauchte Sauerstoff am Manometer direkt in Kubikmillimetern abgelesen. Um Vergleichswerte zu bekommen, wurde der O_2-Verbrauch bei jedem Versuche zuerst in 0,7% NaCl, gewissermaßen als Standard-Lösung, bestimmt, nachdem durch einleitende Versuche festgestellt war, daß kein Unterschied von Frosch-Ringer-Lösung gegen eine mit ihr annähernd isotonische 0,7% NaCl-Lösung in bezug auf die O_2-Absorption vorhanden ist. Die so gefundenen Werte wurden dem Vergleich mit den in anderen Lösungen gefundenen als der normale Sauerstoffverbrauch des isolierten Froschrückenmarkes zugrunde gelegt, und am Schluß zur Prüfung der Reversibilität der beobachteten Änderungen des Gaswechsels das Rückenmark meist wieder in 0,7% NaCl-Lösung zurückgebracht. Die Gesamtdauer des Versuches betrug durchschnittlich 6 bis 8 Stunden, während welcher Zeit der Sauerstoffverbrauch des Rückenmarks in 0,7% NaCl-Lösung fast konstant bleibt. Als Mittel für den letzteren Wert ergab sich aus 25 Versuchen rund 230 cmm pro Gramm und Stunde (reduziert auf 0° und 760 mm Druck).

III. Der Einfluß hypotonischer NaCl-Lösungen.

Für alle untersuchten hypotonischen NaCl-Lösungen gilt, daß das Reflexpräparat nach längerer oder kürzerer Zeit vollkommen reaktionslos wird. Brachte man es möglichst bald nach Eintritt der vollkommenen Reaktionslosigkeit in 0,7% NaCl zurück, so erholte es sich meist. Eine Gesetzmäßigkeit jedoch derart, daß in Lösungen von schwächerer Konzentration die Herabsetzung der Reflexe oder der Zeitpunkt absoluter Unerregbarkeit eher eingetreten wäre als in solchen stärkerer Konzentration, war nicht festzustellen. Es liegt dies offenbar an individuellen Schwankungen.

So war in 0,25% NaCl in einem Falle schon nach 27 Min. eine Herabsetzung der Schnelligkeit der Reaktion bemerkbar,

und nach 85 Min. trat vollkommene Reaktionslosigkeit ein. Bei Wiederholung dieses Versuches an einem anderen Präparat aber war dieses nach 150 Min. Aufenthalt in 0,25 % NaCl noch äußerst schwach erregbar; es erholte sich in 0,7 % NaCl, ebenso wie das vorangehende, nicht wieder. 0,05 % NaCl-Lösung brachte in einem Versuche nach 20 Min. jede Reflexerregbarkeit zum Schwinden. In 0,7 % NaCl trat vollkommene Erholung ein. 0,01 % NaCl dagegen brachte in einem anderen Versuche erst nach 48 Min. die Reflexerregbarkeit zum Schwinden. Das Präparat erholte sich in 0,7 % NaCl ausgezeichnet. In Aqua destillata wurde in einem Versuche sogar erst nach 95 Min. der Eintritt vollkommener Reaktionslosigkeit beobachtet. Auch hier aber wurde in 0,7 % NaCl die frühere Reflexerregbarkeit vollkommen zurückerlangt. — Die Versuche zeigen aufs deutlichste, daß all diese hypotonischen NaCl-Lösungen bis herab zu destilliertem Wasser die Reflexerregbarkeit des isolierten Froschrückenmarkes zwar verschieden rasch, aber doch sicher aufheben, wie dies infolge der durch die Hypotonie bedingten Quellung des Markes und vielleicht auch des Salzaustrittes aus dem Marke in die umgebende Lösung zu erwarten war.

In überraschendem Gegensatz zu diesen Beobachtungen steht nun das Verhalten der Oxydationsvorgänge des Rückenmarkes in den gleichen NaCl-Lösungen.

Denn es ergab sich, daß hypotonische Lösungen die Größe der Sauerstoffabsorption gar nicht beeinflußten. Selbst in destilliertem Wasser waren keine Differenzen gegen 0,7 % NaCl festzustellen, wie deutlich aus folgender Tabelle hervorgeht.

Nr.	O_2-Verbrauch in Kubikmillimeter pro 100 mg u. Stunde in 0,7 % NaCl-Lösung	O_2-Verbrauch in Kubikmillimeter pro 100 mg u. Stunde in		Differenz
1	18,8	Frosch-Ringer:	19,6	+ 0,8
2	27,6	0,5 % NaCl:	28,5	+ 0,9
3	25,5	0,25 % „	25,5	0
4	23,5	0,125 % „	23,2	− 0,3
5	24,3	0,05 % „	22,5	− 1,8
6	23,7	0,01 % „	22,7	− 1,0
7	15,7	Destill. Wasser:	15,7	0
8	25,5	„ „	24,6	− 0,9

Da Abweichungen bis zu 1 cmm in die Fehlergrenzen fallen, sieht man, daß keine Änderung des Sauerstoffverbrauches stattfindet. Ein gleiches Verhalten haben Battelli und Stern[1]) für den Gaswechsel von Pferde-, Ochsen-, Hunde-, Kaninchen-, Hammel- und Taubenmuskeln beobachtet. „Les échanges gazeux du muscle s'accomplissent avec la même intensité dans l'eau destillée ou dans une solution isotonique de NaCl".

Als Beispiel meiner Untersuchungen gebe ich das Protokoll des Gaswechselversuches und des Kontrollversuches Nr. 7 wieder:

a) Gaswechselversuch Nr. 7.

13. X. 1913.

10^{30} wird der Frosch dekapitiert; das fertige Präparat kommt
10^{40} in 0,7%ige NaCl-Lösung.

	Manometerstand	O_2-Absorption cmm	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min.
11^{10}	68,8	4,6	
11^{40}	64,2	4,6	4,8
12^{10}	59,6	5,3	
12^{40}	43,3		
12^{50}	in Aqua destillata.		
1^{20}	66,1	5,1	
1^{50}	61,0		
2^{20}		9,8	
2^{50}	51,2	4,5	4,8
3^{20}	46,7	4,7	
3^{50}	42,0	4,8	
4^{20}	37,2		
4^{30}	in 0,7% NaCl zurückgebracht.		
5^{08}	59,7	5,1	5,05
5^{38}	54,6	5,0	
6^{08}	49,6		

Wasserbadtemperatur: 16,6°.
Barometer: 776,5 mm.
Gewicht: 61,0 mg.

b) Kontrollversuch am Reflexpräparat.

11^{00} Frosch dekapitiert, Reflexpräparat kommt
11^{15} in 0,7%ige NaCl-Lösung.
Reagiert sehr gut auf leichtes Kneifen der Zehen.
11^{45} In Aqua destillata.
11^{55} Reagiert sehr gut, wie in 0,7% NaCl.
12^{10} Reagiert etwas schwächer;
12^{30} reagiert wieder sehr gut; bis

---

[1]) M. F. Battelli et Mlle L. Stern, Action des sels et du glucose sur l'activité respiratoir des tissus anim. isolés. Arch. intern. de Physiol. 4, 465. — Recherches sur la respiration élémentaire des tissus. Journ. de Physiol. et de Pathol. générale 1907, 1 u. 34.

12^50^ alle 10 Min. geprüft, reagiert sehr gut.
1^20^ Vollkommen reaktionslos. Präparat kommt in 0,7 % NaCl zurück; ist
1^30^ absolut unerregbar und bleibt es bis
5^10^ wo leichte Zuckungen auftreten.
5^30^ Stärkere Zuckungen.
5^45^ Präparat ist gut erregbar.
6^10^ Desgl., reagiert auf leichtes Kneifen gut.

IV. Der Einfluß hypertonischer NaCl-Lösungen.

Im Gegensatz zu dem eben beschriebenen Verhalten riefen hypertonische NaCl-Lösungen regelmäßig ein starkes Ansteigen des Sauerstoffverbrauchs hervor:

Nummer	O_2-Verbrauch in cmm pro 100 mg und Std. in 0,7 %iger NaCl-Lösung	O_2-Verbrauch in cmm pro 100 mg und Std. in:	Differenz cmm	Steigerung %
1	22,5	1 %ige NaCl: 32,0	+ 9,5	43,2
2	26,8	1,5 %ige NaCl: 35,4	+ 8,6	32,1
3	26,5	2 %ige NaCl: 36,5	+ 10,0	37,8

Die gleichzeitig angestellten drei Kontrollversuche mit Reflexpräparaten ergaben zunächst im Einklang mit der Steigerung des O_2-Verbrauches auch eine starke Steigerung der Erregbarkeit bis zu spontanen Zuckungen und tetanischen Krämpfen, denen aber eine Abnahme und schließlich in 1,5 und 2 %iger NaCl-Lösung ein Verschwinden der Reflexerregbarkeit folgte, wobei im 2. Versuche jedoch spontane Zuckungen erhalten blieben. Beim Zurückbringen in 0,7 %ige NaCl-Lösung trat im Versuch 3 wieder deutlich Erholung ein, im Versuch 2 sogar wieder unter deutlichen Zeichen erhöhter Erregbarkeit.

Zur Erläuterung dienen die Protokolle von Versuch 3:

a) Gaswechselversuch Nr. 3.

18. X. 1913.

9^45^ Frosch dekapitiert, Rückenmark herausgenommen, kommt
9^55^ in 0,7 %ige NaCl.

	Manometerstand	O_2-Absorption cmm	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min.
10^15^	71,7		
		9,7	
10^45^	62,0		
		9,2	9,5
11^15^	52,8		
		9,5	
11^45^	43,3		

	Manometerstand	O_2-Absorption cmm	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min.
11^{55}	in 2 $^0/_0$ige NaCl-Lösung.		
12^{15}	73,0		
12^{45}	59,0	14,0	
1^{15}	46,4	12,6	13,1
2^{15}	20,8	25,6	
2^{25}	in 0,7 $^0/_0$ige NaCl-Lösung zurück.		
2^{45}	73,0		
3^{15}	62,9	10,1	
3^{45}	52,3	10,6	10,7
4^{15}	40,9	11,4	

Wasserbadtemperatur: 18,9°.
Barometer: 764,0 mm.
Gewicht: 71,8 mg.

b) Kontrollversuch am Reflexpräparat.

10^{27} Frosch dekapitiert, Reflexpräparat kommt
10^{40} in 0,7 $^0/_0$ige NaCl-Lösung.
Reagiert ausgezeichnet.
11^{15} In 2 $^0/_0$ige NaCl-Lösung.
11^{30} bis 11^{35} Normale, gute Reaktion auf Kneifen der Zehen.
11^{35} Spontan unruhiger; Reflexe gut.
11^{50} Größere spontane Zuckungen; Reflexe gut.
12^{05} Reflexe ganz schwach; leise spontane Bewegungen; erhöhte Erregbarkeit.
12^{25} Auf starkes Kneifen erfolgen keine geordneten Reflexbewegungen, sondern nur Muskelzittern. Keine spontanen Bewegungen mehr.
12^{45} Erhöhte Erregbarkeit; ganz schwacher Reflex.
1^{10} bis 1^{40} Äußerst schwache Reflexe.
3^{00} Keinerlei Reflexe mehr auszulösen.
3^{30} In 0,7 $^0/_0$ige NaCl-Lösung zurück.
5^{30} Ganz gute Reaktion auf Kneifen der Zehen.

Vergleicht man schließlich hypo- und hypertonische NaCl-Lösungen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Reflexerregbarkeit des Rückenmarkes, so läßt sich ganz allgemein auf Grund der vorliegenden Versuche konstatieren, daß erstere indifferenter sind als letztere. Zu demselben Ergebnis gelangte schon Silvestro Baglioni[1]), der angibt: „Si trovò tosto, che i centri resistono più a lungo e meglio alle soluzioni ipotoniche, di quello che alle soluzioni ipertoniche; infatti si osservò, che nel primo caso l' eccitabilità riflessa si conserva per parecchie ore inalterata, mentre nel secondo caso essa scompare abbastanza presto."

[1]) Silvestro Baglioni, La Fisiologia del midollo spinale isolato. Zeitschr. f. allgem. Physiol. 4, 384, 1904.

V. Die Bedeutung der Pia mater für den Gaswechsel des Froschrückenmarkes in anisotonischen Lösungen.

1. Hypotonische NaCl-Lösungen.

Die bis jetzt untersuchten Rückenmarke waren bei der Präparation von der äußerst feinen Pia mater nicht befreit, sondern einfach, wie bereits erwähnt, meist in 2 bis 3 Teile zerschnitten zur Untersuchung verwandt worden. An den Schnittstellen nun quoll das Nervengewebe nach dem Aufenthalte in stark hypotonischen Lösungen, insbesondere aber in destilliertem Wasser unförmlich aus der Piahülle heraus, so daß der Gedanke einer schon rein mechanischen Wahrung der Form und Struktur des Markes, infolge des bis auf die Schnittstellen allseitig gleichmäßigen Druckes der Pia mater, nahe lag und mich veranlaßte, zu untersuchen, ob die Oxydationsvorgänge des Rückenmarkes in destilliertem Wasser und hypotonischen NaCl-Lösungen sich anders verhalten, wenn es zuvor von der Pia mater befreit worden ist[1]). Wie berechtigt diese Vermutung war, beweisen aufs schlagendste die Ergebnisse der in dieser Richtung angestellten Versuche, die ausnahmslos ein allmähliches Absinken des O_2-Verbrauches erkennen ließen, um so rascher und stärker, je hypotonischer die Lösung war:

Nr.	O_2-Verbrauch in cmm pro 30 Min. in 0,7 %iger NaCl-Lösung	O_2-Verbrauch in cmm pro 30 Min. in
1	4,4 5,3 5,5 5,2	0,3 %iger NaCl-Lösung: 5,0 4,3 4,6 4,1 4,3
2	7,7 7,6 7,7	0,1 %iger NaCl-Lösung: 7,6 6,1 5,8 5,1 5,0 4,2 4,1
3	10,2 9,4 10,7 9,2	Aqua destillata: . . . 8,1 6,9 5,3 4,9 3,6 3,6
4	7,1 7,2	Aqua destillata: . . . 6,5 4,3 3,2 4,3 3,7 2,7 2,2

Betrachtet man ein piafreies Rückenmark nach $4^1/_2$ stündigem Verweilen in destilliertem Wasser (Versuch 4) und sieht, wie es zu einem wurstförmigen, schleimigen Klumpen geworden ist, dann erscheinen einem die eben mitgeteilten Resultate infolge der schon makroskopisch wahrnehmbaren Zerstörung des Nervengewebes wohl verständlich.

---

[1]) Vergleichende Untersuchungen der Reflexerregbarkeit sind hier leider nicht durchführbar, weil durch das Abziehen der Pia auch alle Rückenmarkswurzeln mitentfernt werden.

2. Hypertonische NaCl-Lösungen.

Wenn auch für hypotonische Lösungen auf Grund der früheren Beobachtungen Änderungen der Oxydationsvorgänge bei fehlender Pia mater von vornherein nicht unwahrscheinlich gewesen waren, so war dies für hypertonische keineswegs der Fall. Wird doch in letzteren die Form und Homogenität des Nervengewebes bei makroskopischer Betrachtung wenigstens nicht sichtbar verändert. Es war daher auch nicht wahrscheinlich, daß das Abziehen der Pia mater die O_2-Absorption des Markes in stärkerem Maße beeinflussen würde.

Ganz wider Erwarten aber blieb die nach den früheren Versuchen zu erwartende Steigerung des O_2-Verbrauchs bei pialosen Rückenmarken aus; es war vielmehr in 1,5 %igen und 2 %igen NaCl-Lösungen eher eine geringe Abnahme bemerkbar. Von einer Steigerung der Oxydationsgröße kann jedenfalls in keinem der fünf vorliegenden Versuche die Rede sein:

Nr.	O_2-Verbrauch in cmm pro 100 mg u. Stunde in 0,7 %iger NaCl-Lösung	O_2-Verbrauch in cmm pro 100 mg u. Stunde in		Differenz
1	21,8	1 %iger NaCl-Lösung:	22,7	+ 0,9
2	22,7	1,5 %iger "	19,6	— 3,1
3	20,0	2 %iger "	20,0	0
4	16,7	2 %iger "	15,1	— 1,6
5	29,6	2 %iger "	26,5	— 3,1

Um den Einfluß der Pia mater einwandfrei feststellen zu können, wurden noch 2 Versuche derart angestellt, daß die Änderung des O_2-Verbrauchs in 2 %iger NaCl-Lösung an ein und demselben Rückenmarke zuerst mit und dann ohne Pia untersucht wurde. Aus ihnen geht, wie die beiden folgenden Versuchsprotokolle zeigen, klar hervor, daß in der Tat die Pia mater für die Änderungen der Oxydationsvorgänge verantwortlich zu machen ist.

Versuch 4.

13. I. 1914.

10^{10} Frosch dekapitiert; Rückenmark herauspräpariert, kommt mit Pia

10^{18} in 0,7 %ige NaCl-Lösung.

	Manometerstand	O_2-Absorption cmm	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min.
10^{40}	74,6		
11^{10}	68,0	6,6	6,45
11^{40}	61,7	6,3	
11^{50}	in 2%ige NaCl-Lösung.		
12^{10}	74,8		
12^{40}	67,6	7,2	7,9
1^{10}	59,0	8,6	
1^{20}	in 0,7%ige NaCl-Lösung zurück.		
1^{40}	72,0		
2^{10}	64,7	7,3	7,35
2^{40}	57,3	7,4	

Jetzt wird die Pia mater abgezogen und das Mark kommt wieder

2^{59}	in 0,7%ige NaCl-Lösung.		
3^{15}	73,5		
3^{45}	69,0	4,5	4,3
4^{15}	65,0	4,0	
4^{25}	in 2%ige NaCl-Lösung.		
4^{40}	73,7		
5^{10}	70,0	3,7	3,9
6^{10}	62,2	7,8	
6^{20}	in 0,7%ige NaCl-Lösung zurück.		
6^{40}	72,0		
7^{40}	65,2	6,8	3,4

Wasserbadtemperatur: 18,1°.
Barometer: 774,5 mm.
Gewicht + Pia: 67,4 mg.
Gewicht — Pia: 51,6 mg.

Versuch 5.

17. I. 1914.

10^{20} Frosch dekapitiert. Rückenmark kommt mit Pia mater
10^{30} in 0,7%ige NaCl-Lösung.

	Manometerstand	Differenz cmm O_2	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min.
10^{55}	64,9		
11^{25}	58,9	6,0	
11^{55}	53,8	5,1	5,8
12^{25}	47,4	6,4	
12^{40}	in 2%ige NaCl-Lösung.		
1^{00}	65,7	8,9	
2^{00}	47,9	8,9	8,9
2^{30}	39,2	8,7	
2^{40}	in 0,7%ige NaCl-Lösung zurück.		
3^{00}	64,8		
3^{30}	56,9	7,9	7,4
4^{00}	50,0	6,9	

Pia mater wird abgezogen und das Mark kommt
4^{15} in 0,7%ige NaCl-Lösung.

	Manometerstand	Differenz ccm O_2	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min.
4^{30}	59,4		
		7,4	
5^{00}	52,0		6,8
		6,2	
5^{30}	45,8		
5^{40}	in 2%ige NaCl-Lösung.		
6^{00}	74,8		
		6,1	
6^{30}	68,7		
		6,3	6,1
7^{00}	62,4		
		5,9	
7^{30}	56,5		

Wasserbadtemperatur: 17,6°.
Barometer: 759,5 mm.
Gewicht + Pia: 62,0 mg.
Gewicht — Pia: 46,0 mg.

3. Erklärung der Bedeutung der Pia mater für den Gaswechsel in anisotonischen Lösungen.

Überblickt man die Versuche mit und ohne Pia mater in hypo- und hypertonischen NaCl-Lösungen, so ergibt sich als plausibelste Erklärung ihres auffälligen Einflusses die Annahme, daß diese feine Haut des Rückenmarks außer ihrer mechanischen Funktion noch die einer semipermeablen Membran erfüllt, die für Wasser durchlässig, für Salze — wenigstens für NaCl — aber nicht oder nur schwer durchgängig ist. Diese Annahme erklärt in zwangloser Weise das verschiedene Verhalten der Oxydationsvorgänge.

In hypotonischen Lösungen kann bei Vorhandensein der Pia mater das Wasser zwar in das Rückenmark hineindiffundieren und vermutlich durch Drucksteigerung die Erregbarkeit aufheben, ein stärkeres Aufquellen wird jedoch rein mechanisch verhütet, und da außerdem die Salze des Nervengewebes am Austritt in die umgebende Lösung verhindert werden, so bleibt die Struktur und die Zusammensetzung des Gewebes im großen ganzen unverändert, und es treten daher auch keine sonderlichen Abweichungen der Oxydationsprozesse von der Norm auf. Entfernt man dagegen die Pia mater, so kann das Wasser ungehindert aus dem hypotonischen Medium in die Zellen eindringen, durch das Aufquellen ihre Struktur zerstören und so den Ablauf der Oxydationsvorgänge in wachsendem Maße beeinträchtigen. Daher die progressive Abnahme des Sauerstoffverbrauchs.

Hypertonische Lösungen entziehen durch die Pia mater hindurch den Zellen Wasser, während umgekehrt das

NaCl trotz seiner höheren Konzentration in der Lösung nicht in das Mark hineindiffundieren kann. Diese Wasserentziehung wäre also die unmittelbare Ursache für die Steigerung der Oxydationsvorgänge und für die Erhöhung und den darauf folgenden Verlust der Reflexerregbarkeit aufzufassen. Fehlt dagegen die Pia mater, so findet keine stärkere Wasserentziehung statt, weil ein freier Diffusionsaustausch nicht bloß des Wassers, sondern auch der Salze unmöglich ist. Damit würde auch der Anlaß zu der auf der Gewebsschrumpfung beruhenden Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs fortfallen.

Diese Hypothese war einer experimentellen Prüfung zugänglich. War die angenommene Semipermeabilität des normalen Rückenmarks wirklich bloß durch die Pia mater bedingt, so mußte bei deren Vorhandensein in hypertonischen Lösungen ein starker Wasser- und damit Gewichtsverlust eintreten, während nach Abziehen der Pia, bei ungehinderter Diffusion auch des NaCl, das Gewicht des Organs sich annähernd konstant halten mußte. Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß das herauspräparierte Rückenmark erst mit und dann ohne Pia abwechselnd auf eine bestimmte Zeit (unter ständiger Durchleitung von Sauerstoff) in 0,7 %ige und in 2 %ige NaCl-Lösung gebracht und die etwa eingetretene Gewichtsänderung bestimmt wurde. Im folgenden seien zunächst die Versuchsprotokolle und dann die tabellarische Zusammenstellung der Resultate wiedergegeben:

Wägeversuch 1.

14. I. 1914.

Rückenmark aus dem Wirbelkanal herausgeschnitten, und, nach gründlicher Abspülung in 0,7 %iger NaCl-Lösung, mit Pia gewogen.

11^{40} Gewicht 63,4 mg.
11^{45} In 2 %ige NaCl-Lösung.
1^{45} Gewogen 58,0 mg.
1^{50} In 0,7 %ige NaCl-Lösung.
3^{30} Gewogen 62,9 mg.
3^{30} Pia mater wird abgezogen und Rückenmark gewogen: 52,1 mg
3^{40} In 0,7 %ige NaCl-Lösung.
5^{00} Gewogen 57,2 mg.
5^{08} In 2 %ige NaCl-Lösung.
7^{08} Gewogen 59,2 mg.

Wägeversuch 2.

17. I. 1914.

Rückenmark mit intakter Pia.

10^{00} In 0,7 %ige NaCl-Lösung.

10^{05} Gewogen 81,5 mg.

10^{30} In 2 %ige NaCl-Lösung.

12^{40} Gewogen 74,0 mg.

1^{00} In 0,7 %ige NaCl-Lösung.

2^{40} Gewogen 78,5 mg.

3^{00} Pia mater abgezogen und Rückenmark gewogen: 55,0 mg.

3^{15} In 0,7 %ige NaCl-Lösung.

4^{50} Gewogen 64,0 mg.

5^{00} In 2 %ige NaCl-Lüsung.

7^{10} Gewogen 62,0 mg.

Wägeversuch 3.

21. I. 1914.

10^{20} Rückenmark herauspräpariert, kommt mit Pia

10^{25} in 0,7 %ige NaCl-Lösung.

10^{30} Gewogen 77,7 mg.

10^{45} In 2 %ige NaCl-Lösung.

12^{45} Gewogen 70,7 mg.

12^{58} In 0,7 %ige NaCl-Lösung zurück.

2^{30} Gewogen 74,25 mg.

Pia mater wird abgezogen und Gewicht des Rückenmarkes allein

2^{47} zu 44,75 mg bestimmt.

3^{00} Rückenmark in 0,7 %ige NaCl-Lösung.

4^{30} Gewogen 50,5 mg.

4^{50} In 2 %ige NaCl-Lösung.

6^{50} Gewogen 49,15 mg.

Wägeversuch 4.

22. I. 1914.

11^{30} Rückenmark herauspräpariert, Pia mater sofort abgezogen, in 0,7 %ige NaCl-Lösung gebracht und gewogen.

11^{40} Gewicht 64,7 mg.

11^{50} In 2 %ige NaCl-Lösung.

1^{50} Gewogen 67,5 mg.

Wägeversuch Nr.	Gewichtsänderung des Rückenmarkes in 2 %iger NaCl-Lösung gegen 0,7 %ige NaCl-Lösung Mit Pia mater		Gewichtsänderung des Rückenmarkes in 2 %iger NaCl-Lösung gegen 0,7 %ige NaCl-Lösung Ohne Pia mater	
	mg	%	mg	%
1	— 5,4	— 8,5	+ 2,0	+ 3,5
2	— 7,5	— 9,2	— 2,0	— 3,1
3	— 7,5	— 9,0	— 1,3	— 2,6
4	—	—	+ 2,8	+ 4,5

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, bestätigen die Wägeversuche die von uns gemachte Annahme in ganz überraschender Weise. Während das von der Pia umhüllte Rückenmark in hypertonischer Kochsalzlösung regelmäßig einen starken Gewichtsverlust aufweist, zeigt das Gewicht des seiner Pia beraubten Rückenmarkes unter den gleichen Bedingungen keine deutliche Änderung, jedenfalls keine Tendenz zur Abnahme. Differenzen von 1 bis 2 mg fallen bei den unvermeidlichen Verschiedenheiten der Benetzung des Organs mit Lösung in das Bereich der Fehlergrenzen.

Die Beobachtung, daß das lipoidreichste Organ des Körpers seine von der Lipoidtheorie geforderte Impermeabilität gegen Kochsalz anscheinend lediglich einer für den Stoffaustausch unter normalen Bedingungen ganz belanglosen äußeren Hülle verdankt, erscheint jedenfalls sehr bedeutungsvoll und soll zum Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen gemacht werden.

VI. Der Einfluß des Calciums.

Der Zusatz von $CaCl_2$ zu NaCl-Lösungen ergab als bemerkenswertes Resultat in hypo-, iso- und hypertonischen Lösungen ausnahmslos eine starke Herabsetzung der Oxydationsprozesse, die im Mittel bei schwächerem $CaCl_2$-Gehalt ca. 20% und bei iso- und hypertonischen Lösungen von reinem $CaCl_2$ sogar ca. 50% gegenüber dem O_2-Verbrauch in 0,7%igen NaCl-Lösungen betrug, wie aus der folgenden Tabelle hervorgeht:

Nr.	O_2-Verbrauch in cmm pro 100 mg und Stunde in	O_2-Verbrauch in cmm pro 100 mg und Stunde in	Differenz in cmm	Differenz in %	Lösung ist gegen 0,7% NaCl
1	0,7% NaCl: 25,5	0,6% NaCl + 0,024% $CaCl_2$: 22,6	− 2,9	− 11,4	hypotonisch
2	do. 26,1	0,6% „ + 0,142% „ 19,7	− 6,4	− 24,5	isotonisch
3	do. 26,4	0,5% „ + 0,285% „ 19,0	− 7,4	− 28,0	isotonisch
4	do. 28,3	0,4% „ + 0,388% „ 24,3	− 4,0	− 14,1	isotonisch
5	do. 26,0	0,3% „ + 0,511% „ 21,4	− 4,6	− 17,7	isotonisch
6	Aqua dest.: 16,8	0,5% $CaCl_2$ 12,9	− 3,9	− 23,3	hypotonisch
7	0,7% NaCl: 27,9	0,996% $CaCl_2$ 10,2	− 17,7	− 63,4	isotonisch
8	do. 24,5	1,423% „ 13,7	− 10,8	− 44,1	hypertonisch
9	do. 26,8	2,135% „ 15,7	− 11,1	− 41,4	hypertonisch
10	do. 32,8	2,846% „ 15,7	− 17,1	− 52,1	hypertonisch

Um die Isotonie der Lösungen zu wahren und eine etwaige Beeinflussung durch den abweichenden osmotischen Druck auszuschalten, wurden die Lösungen in den Versuchen 2 bis 5 derart hergestellt, daß ein immer größerer Teil der 0,7 %igen NaCl-Lösung durch $CaCl_2$ ersetzt wurde. Die Berechnungen wurden mit Hilfe der isotonischen Koeffizienten von de Vries nach Hamburger[1]) ausgeführt. Bei Versuch 6 wurde der Sauerstoffverbrauch zuerst statt in 0,7 % NaCl in Aqua destillata, das ja die Oxydationsgröße nicht ändert, untersucht, darauf in 0,5 %iger $CaCl_2$-Lösung. Diesmal war also die reine $CaCl_2$-Wirkung ohne jede Beeinflussung durch NaCl untersucht worden und ergab das gleiche Resultat.

Hierbei war gleich nach Überführung in die $CaCl_2$-Lösung eine starke Herabsetzung zu beobachten, die im weiteren Verlaufe bei den hypertonischen Lösungen noch eine leichte Verstärkung zeigte, wie z. B. aus dem später angeführten Protokoll von Atmungsversuch 9 hervorgeht.

Die oxydationshemmende Wirkung des Calciums ist schon von Thunberg[2]) an zerschnittenen Froschmuskeln beobachtet worden.

Die Untersuchung der Reflexerregbarkeit ließ mit den Lösungen der Versuche 1 und 2 keine Beeinflussung der Reflexpräparate erkennen. Lösung 3 rief eine Verlängung der Latenzzeit hervor. In Lösung 4 und 5 wurden die Präparate nach 110 bzw. 105 Minuten vollkommen reaktionslos, erholten sich aber in 0,7 %iger NaCl-Lösung wieder. Bei Versuch 7 mit isotonischer und bei den Versuchen 8 bis 10, also in hypertonischen $CaCl_2$-Lösungen ohne NaCl, zeigten die Reflexpräparate ein übereinstimmendes Verhalten. Es traten sofort spontane Zuckungen auf, die sich langsam bis zum Tetanus steigerten; nach wenigen Minuten bereits wurden die Präparate vollkommen reaktionslos, erholten sich aber, wenn man sie in 0,7 % NaCl zurückbrachte, augenblicklich wieder, reagierten sofort, wenn auch ganz schwach, und nach 10 Minuten etwa wieder ganz ausgezeichnet.

---

[1]) H. J. Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre 1, 24, Wiesbaden 1902.

[2]) T. Thunberg, Studien über die Beeinflussung des Gasaustausches des überlebenden Froschmuskels. 1. Mitteil. Skandin. Arch. f. Physiol. 22, 406, 1909; 5. Mitteil. ibid. 24, 62, 1910.

Als Beispiele seien die Protokolle der Atmungsversuche 3 und 9 mit den zugehörigen Kontrollversuchen am Reflexpräparat wiedergegeben.

Atmungsversuch 3.

28. X. 1913.

8^{45} Frosch dekapitiert, Rückenmark kommt
8^{52} in 0,7 %ige NaCl-Lösung.

	Manometerstand	O_2-Absorption cmm	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min.
9^{45}	74,4		
9^{45}	61,8	12,6	
10^{15}	51,0	10,8	11,5
10^{45}	40,0	11,0	
10^{55} in 0,5 % NaCl- + 0,285 % $CaCl_2$-Lösung.			
11^{15}	73,5		
11^{45}	65,2	8,3	
12^{15}	56,9	8,3	
12^{45}	48,7	8,2	8,3
1^{15}	40,4	8,3	
1^{45}	31,9	8,5	
1^{57} in 0,7 %ige NaCl-Lösung zurück.			
2^{15}	72,7		
3^{15}	54,9	17,8	
3^{45}	45,9	9,0	9,1
4^{15}	36,6	9,3	
4^{45}	26,7	9,9	

Wasserbadtemperatur: 18,7°.
Barometer: 757,5 mm.
Gewicht: 87,2 mg.

Kontrollversuch.

28. X. 1013.

9^{25} Reflexpräparat in 0,7 %ige NaCl-Lösung.
10^{00} Reagiert sehr gut.
10^{05} In 0,5 % NaCl- + 0,285 % $CaCl_2$-Lösung, reagiert sehr gut weiter bei Untersuchung alle 10 Min., bis
11^{50} die Reaktion etwas langsamer wird. Dieser Befund wird weiter erhoben, bis
3^{45}, wo das Präparat nach langer Latenzzeit noch gut reagiert.

Atmungsversuch 9.

6. XI. 1913.

11^{55} Frosch dekapitiert, Rückenmark kommt
12^{08} in 0,7 %ige NaCl-Lösung.

	Manometerstand	O_2-Absorption cmm	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min.
12^{30}	74,5		
1^{00}	62,7	11,8	
1^{30}	52,5	10,2	10,9
2^{00}	41,7	10,8	
2^{05} in 2,135 %ige $CaCl_2$-Lösung.			
2^{30}	75,4		
3^{30}	61,0	14,4	
4^{00}	54,8	6,2	6,3
5^{00}	43,7	11,1	
5^{10} in 0,7 %ige NaCl-Lösung zurück.			
5^{30}	73,7		
6^{00}	71,0	2,7?	
6^{30}	67,1	3,9	4,0
7^{00}	62,0	5,1	
7^{30}	57,7	4,3	

Wasserbadtemperatur: 20,0°.
Barometer: 750,0 mm.
Gewicht: 80,2 mg.

Kontrollversuch.

6. XI. 1913.

1^{55} Präparat hergestellt, kommt
2^{05} in 0,7 %ige NaCl-Lösung, reagiert anfangs nur schwach.
3^{45} Reagiert gut.
3^{50} In 2,135 %ige $CaCl_2$-Lösung. Momentanes Auftreten von spontanen, sich bis zum Starrkrampf steigernden Zuckungen.
3^{52} Vollkommen reaktionslos.
3^{54} In 0,7 %ige NaCl-Lösung zurück.
4^{15} Äußerst schwache Reflexe.
4^{45} Reagiert gut.
6^{00} Schwächere Reaktion. Beim nochmaligen Einbringen in die 2,135 %ige $CaCl_2$-Lösung wird das Präparat ohne jede Zuckung sofort reaktionslos.

VII. Der Einfluß des Kaliums.

In hypo- und isotonischen KCl-haltigen Lösungen war bei einem Vergleich der Mittelwerte aus 5 bis 10 halbstündigen Ablesungen mit den Normalwerten kein deutlicher Einfluß auf die Oxydationsvorgänge bemerkbar, wie leicht in der umstehenden Tabelle zu übersehen ist. In hypertonischen Lösungen dagegen war eine starke Hemmung unverkennbar (Versuch 9 und 10).

In den drei ersten Versuchen mit schwachem KCl-Gehalt zeigten sich starke halbstündige Schwankungen, so daß anfangs der O_2-Verbrauch unter die Norm absank und darauf über die Norm stieg. Der Durchschnittswert der Ablesungen jedoch

Nr.	O_2-Verbrauch in cmm pro 100 mg und Stunde in	O_2-Verbrauch in cmm pro 100 mg und Stunde in	Differenz	Lösung ist gegen 0,7 % NaCl
1	0,7 % NaCl: 22,8	0,6 % NaCl + 0,042 % KCl: 24,0	+ 1,2	hypotonisch
2	do. 27,0	0,6 % „ + 0,127 % „ 26,8	— 0,2	isotonisch
3	do. 33,7	0,4 % „ + 0,382 % „ 33,9	+ 0,2	isotonisch
4	do. 36,2	0,2 % „ + 0,637 % „ 32,8	— 3,4	isotonisch
5	do. 24,0	do. + do. 24,6	+ 0,6	isotonisch
6	do. 23,2	0,892 % KCl 25,9	+ 2,7	isotonisch
7	do. 23,5	do. 22,7	— 0,8	isotonisch
8	Aqua dest.: 26,2	do. 26,2	± 0	isotonisch
9[1]	0,7 % NaCl: 24,4	1,275 % KCl 17,8	— 6,6	hypertonisch
10	do. 25,8	2,549 % „ 16,4	— 9,4	hypertonisch

zeigte, wie oben erwähnt, keine Änderung der Oxydationsgröße gegen 0,7 % NaCl. Als Beispiele seien die Protokolle von Versuch 2 und 3 wiedergegeben:

Versuch 2.

13. XI. 1913.

9^{10} Frosch dekapitiert, Rückenmark kommt 9^{15} in 0,7 %ige NaCl-Lösung.

	Manometerstand	O_2-Absorption cmm	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min.
10^{00}	75,0		
10^{30}	59,2	15,8	
11^{00}	45,7	13,5	14,3
11^{30}	32,1	13,6	
11^{40} in 0,6 % NaCl- + 0,127 % KCl-Lösung.			
12^{00}	75,0		
12^{30}	64,0	11,0	
1^{00}	51,0	13,0	
1^{30}	37,5	13,5	
2^{00}	23,0	14,5	14,2
2^{30}	8,0	15,0	
2^{35}	67,3		
3^{05}	51,2	16,1	
3^{35}	35,0	16,2	
3^{47} in 0,7 %ige NaCl-Lösung zurück.			
4^{05}	74,0		
4^{35}	62,6	11,4	
5^{05}	49,8	12,8	12,3
5^{35}	37,0	12,8	

Wasserbadtemperatur: 18,4°.
Barometer; 747,0 mm.
Gewicht: 106,0 mg.

[1]) Wägung mißglückt, Werte daher nicht auf 100 mg umgerechnet.

Versuch 3.

14. XI. 1913.

9^{00} Frosch dekapitiert; Rückenmark kommt
9^{10} in 0,7 %ige NaCl-Lösung.

	Manometerstand	O_2-Absorption cmm	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min.
10^{05}	75,2		
		13,4	
10^{35}	61,8		
		13,7	13,6
11^{05}	48,1		
		13,6	
11^{35}	34,5		
11^{45} in 0,4 % NaCl- + 0,382 % KCl-Lösung.			
12^{15}	75,0		
		11,7	
12^{45}	63,3		
		12,8	
1^{15}	50,5		
		14,4	13,7
1^{45}	36,1		
		14,6	
2^{15}	21,5		
		14,9	
2^{45}	6,6		
2^{55} in 0,7 %ige NaCl-Lösung zurück.			
3^{15}	74,6		
		13,3	
3^{45}	61,3		
		11,4	12,5
4^{15}	49,9		
		12,9	
4^{45}	37,0		

Wasserbadtemperatur: 19,2°.
Barometerstand: 743,5 mm.
Gewicht: 80,7 mg.

Auf die Reflexerregbarkeit übten die schwachen Konzentrationen von 0,042 und 0,127 % KCl keine deutliche Wirkung aus. In den Versuchen 3 bis 8 dagegen war nach kurzer Zeit (10 bis 20 Minuten) jede Reaktion erloschen. In Lösung 3 bis 5 erholten sich die Präparate, in 0,7 % NaCl gebracht, wieder, in Lösung 6 bis 8 dagegen nicht. Desgleichen schädigten die hypertonischen Lösungen 9 und 10 derartig, daß schon nach 70 Sekunden in einer 2,549 %igen KCl-Lösung jede Erregbarkeit erloschen war und auch in 0,7 % NaCl nicht mehr zurückkehrte.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Versuche mit den Beobachtungen von Battelli und Stern[1]) und von Thunberg[2]) über den Gaswechsel verschiedener Tiermuskeln, so erkennt man, daß der Gaswechsel des Nervengewebes des Frosches im ganzen ähnlichen Bedingungen unterliegt. So geben erstere Autoren an:

[1]) M. F. Battelli et Mlle L. Stern, Action des sels et du glucose sur l'activité resp. des tissus anim. isolés. Arch. int. de Physiol. 4, 465, 1902.

[2]) T. Thunberg, Studien über die Beeinflussung des Gasaustausches usw. Skand. Arch. f. Physiol., 1. Mitteil. 22, 422, 1909 und 7. Mitteil. 24, 78, 1910.

„Les sels de K et les sels de Na exercent à peu près la même influence sur l'activité respiratoir du muscle“, und Thunberg kommt zu dem Ergebnis, daß KCl und KBr sehr indifferente Stoffe für den Gaswechsel des überlebenden Froschmuskels seien und daß KCl zwar, wie schon früher bekannt, ein Contractionsgift, nicht aber ein Oxydationsgift für die Muskeln ist. Auch unsere Versuche ergaben für die isotonischen und hypotonischen KCl-haltigen Lösungen insofern analoge Resultate, als die stärkeren KCl-Dosen zwar die Erregbarkeit aufhoben, die Mittelwerte des O_2-Verbrauchs aber nicht deutlich beeinflußten. In hypertonischen Lösungen aber war eine deutliche Herabsetzung desselben feststellbar, die — da die Hypertonie an sich ja oxydationssteigernd wirkt — nur auf das KCl zurückgeführt werden kann. In großen Gaben wirkt dieses für das Nervensystem also auch als Oxydationsgift.

VIII. Der Einfluß des Zusammenwirkens von NaCl, $CaCl_2$ und KCl.

Hatten die bisher angeführten Versuche bereits ergeben, daß von einer antagonistischen Wirkung der Na-Ionen einer-

Nr.	Mittelwert des O_2-Verbrauchs in cmm pro 30 Min. in:	
1	0,7 % NaCl-Lösung	13,7
	0,6 % NaCl- + 0,127 % KCl-Lösung	10,0
	0,854 % $CaCl_2$- + 0,127 % KCl-Lösung	7,5
2	0,7 % NaCl-Lösung	11,5
	0,6 % NaCl- + 0,142 % $CaCl_2$-Lösung	9,25
	0,6 % NaCl- + 0,127 % KCl-Lösung	10,0
	0,7 % NaCl-Lösung	9,6
3	0,7 % NaCl-Lösung	9,7
	0,6 % NaCl- + 0,142 % $CaCl_2$-Lösung	7,1
	0,765 % KCl- + 0,142 % $CaCl_2$-Lösung	7,4
4	0,7 % NaCl-Lösung	11,1
	0,6 % NaCl- + 0,142 % $CaCl_2$-Lösung	8,5
	0,5 % NaCl- + 0,142 % $CaCl_2$- + 0,127 % KCl-Lösung	6,6
5	0,6 % NaCl- + 0,142 % $CaCl_2$-Lösung	7,2
	0,5 % NaCl- + 0,142 % $CaCl_2$- + 0,127 % KCl-Lösung	6,0
	0,7 % NaCl-Lösung	6,4
6	0,7 % NaCl-Lösung	11,25
	2,77 % Dextrose- + 0,142 % $CaCl_2$-Lösung	7,3
	2,31 % Dextrose- + 0,142 % $CaCl_2$- + 0,127 % KCl-Lösung	4,2
7	0,7 % NaCl-Lösung	8,7
	2,77 % Dextrose- + 0,127 % KCl-Lösung	9,0
	2,31 % Dextrose- + 0,127 % KCl- + 0,142 % $CaCl_2$-Lösung	7,8

seits, der K- und Ca-Ionen andererseits, wie sie J. Loeb als allgemeines Gesetz aufstellen wollte, hinsichtlich der Oxydationsvorgänge keine Rede sein kann, so war noch zu untersuchen, ob eine solche antagonistische Wirkung vielleicht zwischen K und Ca besteht, so wie dies etwa hinsichtlich der Beeinflussung der Herztätigkeit bekannt ist. Es wurde also untersucht, ob die oxydationshemmende Wirkung des Ca durch Zusatz von K in destilliertem Wasser oder NaCl-Lösungen aufgehoben werden könnte. Ein solcher Einfluß war jedoch nicht feststellbar, wie aus der vorstehenden Zusammenstellung ersichtlich ist. Auch Versuche, in denen das NaCl zur Ausschaltung der etwaigen Wirkung des Natriums durch isotonische Traubenzuckerlösung ersetzt war, führten zu keinem anderen Resultat.

Zusammenstellung der Ergebnisse.

1. Die Größe des Sauerstoffverbrauchs des isolierten Froschrückenmarks beträgt in 0,7 %iger NaCl-Lösung bei einem O_2-Druck von 1 Atmosphäre im Mittel rund 230 cmm pro Gramm und Stunde, reduziert auf 0° und 760 mm Druck.

2. Hypotonische NaCl-Lösungen bis herunter zu destilliertem Wasser üben keinen Einfluß auf die Oxydationsgröße des von der Pia mater umhüllten Rückenmarks aus, während sie die Reflexerregbarkeit früher oder später in meist reversibler Weise aufheben.

3. Hypertonische Kochsalzlösungen verursachen eine bedeutende Steigerung des Sauerstoffverbrauchs des von der Pia mater umhüllten Rückenmarks und eine anfängliche Steigerung und nachfolgende Aufhebung der Reflexerregbarkeit.

4. Die Pia mater übt einen großen Einfluß auf das Verhalten der Oxydationsvorgänge des Rückenmarks in verschieden konzentrierten NaCl-Lösungen aus. Nach Entfernung derselben sinkt in hypotonischen Lösungen der Sauerstoffverbrauch immer mehr ab; in hypertonischen Lösungen bleibt die sonst zu beobachtende Steigerung des O_2-Verbrauchs aus.

Die Erklärung für dieses Verhalten ist darin zu suchen, daß in hypotonischen Lösungen die Pia eine stärkere Aufquellung mechanisch verhindert, während eine solche nach Entfernung der Pia eintritt und zu einer Zerstörung der Struktur des Organs führt. Die Pia wirkt ferner als semipermeable, für

NaCl nicht oder schwer durchgängige Membran, die in hypertonischen Lösungen eine Schrumpfung des Organs veranlaßt, die als unmittelbare Ursache der Oxydationssteigerung anzusehen ist. Nach Entfernung der Pia fällt diese Schrumpfung fort, weil das NaCl jetzt frei eindringen kann. Die Richtigkeit dieser Erklärung ergibt sich aus Wägeversuchen, die dartun, daß das von der Pia umhüllte Rückenmark in hypertonischen NaCl-Lösungen einen Gewichtsverlust erleidet, während nach Entfernung der Pia das Gewicht annähernd konstant bleibt. Das seiner Pia beraubte Rückenmark zeigt mithin die nach der Lipoidtheorie zu erwartende Impermeabiltät gegen Kochsalz nicht mehr.

5. Ca-Salze bewirken in jeder Konzentration eine Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs; die Reflexerregbarkeit wird durch stärkere Dosen reversibel aufgehoben.

6. K-Salze zeigen in iso- und hypotonischen Lösungen keine deutliche Beeinflussung, in hypertonischen Lösungen bewirken sie eine Herabsetzung des Sauerstoffverbrauchs. Die Reflexerregbarkeit wird schon durch schwache Konzentrationen aufgehoben, durch stärkere irreversibel.

7. Oxydationsprozesse und Reflexerregbarkeit zeigen eine weitgehende Unabhängigkeit voneinander.

8. Irgendwelcher Antagonismus in der Wirkung von Na-, K- und Ca-Ionen ist hinsichtlich des Sauerstoffverbrauchs nicht feststellbar.

Schließlich erfülle ich noch die angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. H. Winterstein, für die Anregung zu dieser Arbeit und vielfache Unterstützung mit Rat und Tat dabei meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Der Einfluß verschiedener Ionen auf das Überleben des Zentralnervensystems von Säugetieren.

Von

Paul Gerlach.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 4. März 1914.)

Mit 4 Figuren im Text.

I. Einleitung.

Das Lebenderhalten einzelner Organe oder ganzer Organismen durch Speisung mit einer Nährflüssigkeit nach Ausschaltung des normalen Kreislaufes stellt eine der wichtigsten Untersuchungsmethoden der neueren physiologischen Forschung dar. Durch dieses „Überleben" ist es möglich, unabhängig von den in ihrer Kompliziertheit schwer zu übersehenden natürlichen Bedingungen Funktion und Stoffwechsel der Organe zu studieren.

Diese Untersuchungen ließen sich für die Organe der Kaltblüter und auch für manche der Warmblüter verhältnismäßig leicht durchführen. Auf größere Schwierigkeiten stieß man jedoch bei dem Versuche, das Zentralnervensystem der Säugetiere mit Hilfe der künstlichen Durchspülung am Leben zu erhalten.

Einen geschichtlichen Überblick über diese Arbeiten hat vor kurzem H. W. Langendorff[1]) gegeben. Erst H. Winterstein[2]) gelang es, neugeborene Säugetiere bei völligem Ersatz des Blutes durch Salzlösungen längere Zeit am Leben zu erhalten. Der gleichen Methodik haben sich Herlitzka[3]) bei

---

[1]) H. W. Langendorff, Das Überleben des Zentralnervensystems von Säugetieren bei künstlicher Durchspülung. Innaug.-Diss. Rostock 1913.

[2]) H. Winterstein, Das Überleben neugeborener Säugetiere bei künstlicher Durchspülung. Wiener med. Wochenschr. **1910**, Nr. 39. — Die Regulierung der Atmung durch das Blut. Arch. f. d. ges. Physiol. **138**, 167, 1911.

[3]) A. Herlitzka, Sui liquidi atti a conservare la funzione dei tessuti sopraviventi. VI. Arch. di fisiol. **10**, 261, 1912.

winterschlafenden Säugetieren, Laqueur und Verzár[1]) an neugeborenen und H. W. Langendorff[2]) an älteren Säugetieren bedient, um die für die Erhaltung der Zentrenfunktionen geeigneten Bedingungen zu ermitteln.

Die im folgenden mitgeteilten Experimente hatten den Zweck, systematisch die Wirkung verschiedener Ionen auf das Überleben des Zentralnervensystems von Säugetieren zu untersuchen und auf diese Weise die hierfür am besten geeignete anorganische Lösung festzustellen.

Solche Versuche haben ja nicht bloß methodisches Interesse, sondern gewähren gleichzeitig einen gewissen Einblick in die Lebensbedingungen und mitunter auch in den Stoffwechsel des betreffenden Organs.

II. Versuchsmethodik.

Das mit Äther narkotisierte Tier wurde auf dem Operationsbrett ausgespannt. Dann wurde die Aorta freigelegt und in sie gleich bei ihrem Ursprung aus dem Herz eine Kanüle eingebunden. Eine genaue Beschreibung dieser Operation gibt H. Winterstein[3]). Nach Aufschneiden der rechten Herzkammer wurde durch die Kanüle die Durchspülungsflüssigkeit in kontinuierlichem Strome eingeleitet, da nach unseren früheren Untersuchungen[4]) die rhythmische Durchströmung keinerlei Vorteile bietet.

Die Durchspülungsvorrichtung bestand aus einem durch einen Dreiweghahn verbundenen Zweiflaschensystem, in dem der Druck durch ein Wasserventil reguliert wurde. So war es möglich, das Versuchstier abwechselnd mit den zu vergleichenden verschiedenartig zusammengesetzten Lösungen zu durchspülen.

Vor Beginn eines jeden Versuches wurde die Durchströmungsflüssigkeit mit Sauerstoff gesättigt.

Die Temperatur der Lösung betrug 18 bis 20°. Durch

[1]) E. Laqueur und F. Verzár, Über die spezifische Wirkung der Kohlensäure auf das Atemzentrum. Arch. f. d. ges. Physiol. 143, 395, 1912.

[2]) H. W. Langendorff, a. a. O.

[3]) H. Winterstein, a. a. O.

[4]) Paul Gerlach, Vergleichende Versuche über die Wirkung rhythmischer und kontinuierlicher Durchspülung. Arch. f. d. ges. Physiol. 147, 71, 1912.

diese niedrige Temperatur wird der Stoffwechsel des ganzen Organismus herabgesetzt, und das Versuchstier läßt sich viel leichter überlebend erhalten, als wenn es mit körperwarmer Lösung durchspült wird (H. Winterstein[1]).

Als Indicator für die Funktion des Zentralnervensystems dienten die Reaktionen auf Kneifen und bei älteren Tieren auch der Cornealreflex.

III. Versuchsergebnisse.

A. Versuche an neugeborenen Säugetieren.

Weil sich nach H. Winterstein[1]) besonders neugeborene Tiere dazu eignen, die günstigsten Bedingungen für die Fortdauer des Lebens nach Ausschaltung des Blutstromes zu ermitteln, wurden für die Hauptversuche 3 bis 10 Tage alte Kaninchen und Katzen verwendet.

Es wurde zunächst die Wirkung der Natrium-, Kalium- und Calcium-Ionen untersucht, indem von den einzelnen Bestandteilen der Ringer-Lösung ausgegangen wurde, und diese Bestandteile verschiedenartig kombiniert und in ihren Mengenverhältnissen verändert wurden.

Ferner wurde untersucht, ob sich diese Ionen durch andere ersetzen lassen.

1. Die Wirkung des Natriums, Kaliums und Calciums.

Eingehende Untersuchungen über die physiologische Bedeutung der verschiedenen Ionen für den lebenden Organismus verdanken wir vor allem Jacques Loeb[2]).

Er untersuchte zunächst die Wichtigkeit der Bestandteile des Seewassers für die Entwicklung von Seeigeleiern und kam zu dem Schluß, Natrium-, Calcium- und Kalium-Ionen seien hierfür unerläßlich. Dies Resultat wurde durch Versuche, die Loeb an Medusen, Tubularien und Fischen und an deren Eiern unternahm, erhärtet.

Er forschte denn auch nach der Ursache der Bedeutung der drei Ionen, wobei der Fundulus heteroclitus, ein Seefisch, und dessen Eier als Versuchsobjekt dienten. Diese Experi-

[1]) H. Winterstein, a. a. O.

[2]) Vgl. J. Loeb, Über physiologische Ionenwirkungen, insbesondere die Bedeutung der Na-, Ca- und K-Ionen. Handb. d. Biochemie, herausgegeben von Oppenheimer 2, 1. Hälfte 1910.

mente zeitigten das interessante Resultat, daß Funduluseier wochenlang in destilliertem Wasser leben konnten, aber nicht in einer Kochsalzlösung, die dieselbe Menge NaCl wie das Seewasser enthielt. Als Loeb zu dieser NaCl-Lösung noch $CaCl_2$ hinzufügte, sah er, daß in solcher Lösung alle Eier Embryonen bilden, aber die jungen Fische darin noch nicht leben konnten. Das war erst möglich, als er auch noch Kalium zusetzte. Er schließt hieraus, daß zur völligen Entgiftung der schädlichen NaCl-Lösung Calcium- und Kalium-Ionen nötig sind. Verringerte er nun den NaCl-Gehalt der Lösung, so wurde ein entsprechender Teil der Ca- und K-Ionen nicht nur entbehrlich, sondern dieser Überschuß wirkte auf das Tier sogar schädigend.

Alle diese Erfahruugen brachten Loeb zu der Aufstellung des Begriffes der physiologisch-äquilibrierten Lösung. Er versteht hierunter solche Lösungen, „die Salze von solcher Art und in solchen Mengenverhältnissen enthalten, daß alle Giftwirkungen verschwinden, die jeder Bestandteil haben würde, wenn er allein in der Lösung wäre".

Loeb stellte auch fest, daß der für die Lebewesen nötige osmotische Druck nicht durch beliebige Stoffe geliefert werden kann, sondern allein durch Na-, K- nnd Ca-Ionen. Loeb ist weiterhin der Ansicht, daß diese drei Ionen „sich mit bestimmten kolloidalen Körpern in den Zellen beispielsweise Eiweißkörpern oder den Anionen von Fettsäuren oder Lecithinen usw. verbinden und daß zum normalen Ablauf des Lebens diese drei Metallionen in bestimmten Verhältnissen in diesen Verbindungen vorhanden sein müssen".

Was die Wirkungsweise der Na-, K- und Ca-Ionen untereinander anbelangt, so betont Loeb, wie wir eben sahen, besonders die gegensätzliche Wirkung zwischen Natrium einerseits und Kalium und Calcium andererseits.

Ringer[1]), Locke[2]) und O. Langendorff[3]) fanden, daß

---

[1]) S. Ringer, A third contribution regarding the influence of the inorganic constituents of the blood on the ventricular contraction. Journ. of Physiol. 4, 222, 1883.

[2]) F. S. Locke, Towards the ideal artificial circulating fluid for the isolated frog's heart. Journ. of Physiol. 18, 332, 1895.

[3]) O. Langendorff, Über die angebliche Unfähigkeit des lackfarbenen Blutes, den Herzmuskel zu ernähren. Arch. f. d. ges. Physiol, 93, 286, 1903.

auch ein Antagonismus zwischen den Kalium- und Calcium-Ionen besteht. Langendorff gelangte zu diesem Ergebnis durch Versuche am Katzenherzen und stellte fest, daß zum Ablauf einer regelmäßigen Herztätigkeit die Anwesenheit von Calcium- und Kaliumsalzen erforderlich sei; der Antagonismus, der zwischen beiden besteht, wurde daraus klar, daß eine Vermehrung der Kalium-Ionen auch eine Vermehrung der Calcium-Ionen nötig machte.

Wenden wir uns jetzt der Wirkung der einzelnen Ionen auf den Organismus zu, so müssen wir in erster Linie das Natrium betrachten; denn die einfachste und ursprüngliche Flüssigkeit, die man zum Überlebenderhalten von Organen verwendet hat, stellt die physiologische NaCl-Lösung dar, die 0,7% NaCl für Kaltblüter und 0,9% für Warmblüter enthält. Tatsächlich gelingt es mit dieser Lösung, wenigstens Kaltblüterorgane eine Zeitlang am Leben zu erhalten; so konnte Baglioni[1]) mit einfacher NaCl-Lösung die Reflexerregbarkeit des isolierten Froschrückenmarks längere Zeit aufrechterhalten. Alle Autoren sind sich aber darin einig, daß bei längerer Einwirkung das NaCl für sich allein einen schädlichen Einfluß auf die meisten Gewebe ausübt. H. Rusch[2]) stellte dies u. a. am Säugetierherzen fest, Cushing[3]) am Nervmuskelpräparat, Biedermann[4]) am quergestreiften Muskel und Bethe[5]) an den rhythmischen Bewegungen der Medusen. Diese Schädigung des Organismus durch das Kochsalz läßt sich, wie u. a. Joseph und Meltzer[6]) am Froschmuskel konstatierten, durch Zuleitung einer calciumhaltigen Lösung wieder beseitigen.

[1]) S. Baglioni, La fisiologia del midollo spinale isolato. Zeitschr. f. allg. Physiol. 4, 384, 1904.

[2]) H. Rusch, Experimentelle Studien über die Ernährung des isolierten Säugetierherzens. Arch. f. d. ges. Physiol. 73, 535, 1898.

[3]) H. Cushing, Concerning the poisonous effect of pure sodium chloride solutions upon the nerve-muscle preparation. Americ. Journ. of Physiol. 6, 77, 1902.

[4]) W. Biedermann, Über rhythmische durch chemische Reizung bedingte Contractionen quergestreifter Muskeln. Sitzungs-Ber. der Wiener Akad. 81, III. Abt., 257, 1886.

[5]) A. Bethe, Die Bedeutung der Elektrolyten für die rhythmischen Bewegungen der Medusen. Arch. f. d. ges. Physiol. 124, 541, 1908.

[6]) Joseph und Meltzer, Die Einflüsse von NaCl und $CaCl_2$ auf die indirekte und direkte Erregbarkeit von Froschmuskeln. Centralbl. f. Physiol. 23, 350, 1909.

Kalium für sich allein wirkt nach den Angaben sämtlicher Beobachter stark giftig. O. Langendorff[1]) und E. Groß[2]) sahen den sehr schädlichen lähmenden Einfluß einer Kaliumlösung auf das isolierte Säugetierherz, E. Overton[3]) besonders auf die Nervenendigungen des Frosches, P. Grützner[4]) auf die motorischen Froschnerven und H. J. Hamburger[5]) auf die Phagocyten. Auch diese Kaliumschädigung läßt sich nach Overton[3]) durch eine $CaCl_2$-haltige Nährlösung aufheben.

Ganz im Gegensatz zum Kalium finden wir fast bei allen Autoren die Angabe, das Calcium beeinflusse den überlebenden Organismus günstig. Nach O. Langendorff[6]) übt die intravenöse Einspritzung einer $CaCl_2$-Lösung eine kräftigende Wirkung auf die Contractionen des Säugetierherzens aus. Ohne Kalksalze ist nach Langendorff überhaupt keine regelmäßige Herztätigkeit möglich. Auch Locke[7]) und E. Groß[8]) stellten diesen vorteilhaften Einfluß des Calciums auf das isolierte Herz fest. Einen ganz besonders günstigen Einfluß selbst ganz kleiner Calciummengen beobachtete Hamburger[9]) bei Phagocyten. Nach den Arbeiten von Mines[10]) und von Cushing[11]) wirkt das Calcium auf den neuromuskulären Apparat des Frosches günstig, nach Chiari und Fröhlich[12]) auf das sympathische Nervensystem der Katze. Endlich sei noch erwähnt, daß

---

[1]) O. Langendorff, a. a. O.

[2]) E. Groß, Die Bedeutung der Salze der Ringerschen Lösung für das isolierte Säugetierherz. Arch. f. d. ges. Physiol. 99, 264, 1903.

[3]) E. Overton, Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. Arch. f. d. ges. Physiol. 105, 176, 1904.

[4]) P. Grützner, Über chemische Reizungen von motorischen Nerven. Arch. f. d. ges. Physiol. 53, 83, 1893.

[5]) H. J. Hamburger, Physikalisch-chemische Untersuchungen über Phagocyten. Wiesbaden, J. F. Bergmann 1912.

[6]) O. Langendorff, a. a. O.

[7]) Locke, The action of dextrose on the isolated mammalian heart. Journ. of Physiol. 31; Proc. Roy. Soc. 1904, XIII.

[8]) E. Groß, a. a. O.

[9]) H. J. Hamburger, a. a. O.

[10]) Mines, On the replacement of calcium in certain neuromuscular mechanismus by allied substances. Journ. of Physiol. 42, 251, 1911.

[11]) Cushing, a. a. O.

[12]) Chiari und Fröhlich, Erregbarkeitsänderung des vegetativen Nervensystems durch Kalkentziehung. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 64, 214, 1911.

Battelli[1]), der Durchspülungsversuche mit körperwarmer Lösung an Meerschweinchen anstellte, mit einer chlorcalciumhaltigen Kochsalzlösung eine erhebliche und konstante Zunahme der Reflexe erzielte. Allerdings war die längste Zeit, während der er Reflexe auslösen konnte, nur 7 Minuten 45 Sekunden. Dies Resultat erzielte er mit einer Lösung, die NaCl im Verhältnis 8:1000 und $CaCl_2$ 1:5000 enthielt.

Aus allen diesen Angaben gewinnt man den Eindruck, daß das Calcium im Stoffwechsel des gesamten Organismus, ganz besonders aber bei der Funktion des Nervensystems eine überaus wichtige Rolle spielt. Hiermit stimmt auch die Feststellung von Forster[2]) und von Heitzmann[3]) überein, die an Hunden bei kalkarmer oder -freier Kost Störungen in den nervösen Zentralapparaten beobachteten.

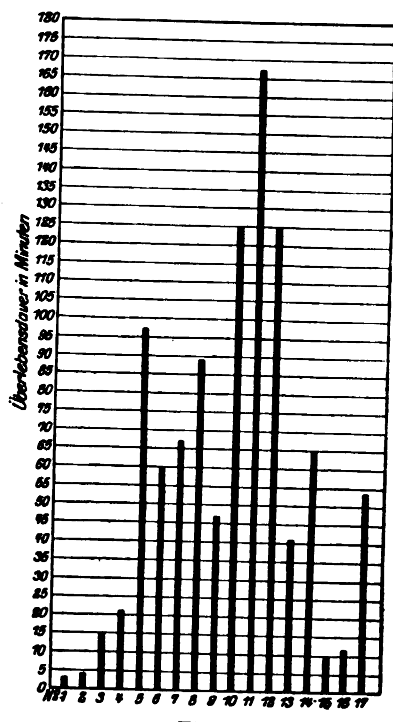


Fig. 1.

Es darf nicht unerwähnt bleiben, daß die Zufuhr einer zu großen Calciummenge lähmend wirkt. Das beobachtete Hamburger[4]) bei Phagocyten, Bethe[5]) bei Medusen, Rona und Neukirch[6]) an den Bewegungen des überlebenden Darmes und O. Langendorff und W. Hueck[7]) am isolierten Froschherzen.

[1]) F. Battelli, Influence des différents composants du sang sur la nutrition des centres nerveux. Journ. de physiol. et pathol. générale 2, 993, 1900.
[2]) Forster, Zeitschr. f. Biol. 12, 464, 1876.
[3]) Heitzmann, Anzeiger d. Kaiserl. Akad. d. Wiss. Wien 1873, Nr. 17.
[4]) H. J. Hamburger, a. a. O.
[5]) Bethe, a. a. O.
[6]) P. Rona und P. Neukirch, Experimentelle Beiträge zur Physiologie des Darmes. III. Arch. f. d. ges. Physiol. 148, 273, 1912.
[7]) O. Langendorff und W. Hueck, Die Wirkung des Calciums auf das Herz. Arch. f. d. ges. Physiol. 96, 473, 1903.

Wenden wir uns nun nach diesem Ausblick auf die Literatur zu unseren eigenen Versuchsergebnissen, so werden diese am klarsten an der Hand einer graphischen Darstellung (Fig. 1).

Alle diese Versuche wurden mit neugeborenen Kaninchen vorgenommen, nur Versuch 11, 14 und 15 an neugeborenen Katzen.

Zusammensetzung der Durchspülungsflüssigkeit.
(In Klammern die Zahlen für krystallwasserhaltiges $CaCl_2$.)

Versuch	
1, 2	0,9 % NaCl
3, 4	0,9 % NaCl + 0,042 % KCl
5	0,9 % NaCl + 0,024 % $CaCl_2$ (0,047 %)
6	0,9 % NaCl + 0,042 % KCl + 0,024 % $CaCl_2$ (0,047 %) = Ringer-Lösung
7	0,9 % NaCl + 0,042 % KCl + 0,048 % $CaCl_2$ (0,094 %)
8	0,8 % NaCl + 0,042 % KCl + 0,060 % $CaCl_2$ (0,118 %)
9	0,8 % NaCl + 0,084 % KCl + 0,048 % $CaCl_2$ (0,094 %)
10	0,9 % NaCl + 0,048 % $CaCl_2$ (0,094 %)
11	0,9 % NaCl + 0,051 % $CaCl_2$ (0,1 %)
12	0,9 % NaCl + 0,060 % $CaCl_2$ (0,118 %)
13	0,8 % NaCl + 0,102 % $CaCl_2$ (0,2 %)
14	0,6 % NaCl + 0,340 % $CaCl_2$ (0,67 %)
15	0,4 % NaCl + 0,527 % $CaCl_2$ (1,04 %)
16	1,1 % NaCl + 0,051 % $CaCl_2$ (0,1 %)
17	0,6 % NaCl + 0,051 % $CaCl_2$ (0,1 %)

Im Anschluß an diese Tabelle lassen wir gleich einige Beispiele aus den Versuchsprotokollen folgen.

Versuch 6.

2. VI. 1913. Zirka 5 Tage altes Kaninchen.
Äthernarkose. Operation.

2^{53} Beginn der Durchspülung mit Ringer-Lösung. Das Tier wird sofort munter; kräftige Spontanbewegungen.
3^{00} Sehr starke Reaktion überall, Spontanbewegungen, Atmung.
3^{10} Reaktion überall, Spontanbewegungen.
3^{15} „ „ , Ödem am Halse.
3^{20} „ „ , das Ödem wächst schnell.
3^{25} Gute Reaktion überall. Atmung, Ödem auch an der hinteren Extremität. Spontanbewegungen mit dem ganzen Körper.
3^{30} Reaktion überall. Spontanbewegungen.
3^{35} Reaktion.

3^{40} Schwache Reaktion nur an der vorderen Extremität.

3^{45} „ „ „ „ „ „ „ . Spontanbewegungen.

3^{50} Reaktion nur auf starken Reiz.

3^{52} Sehr schwache Reaktion.

3^{55} Keine Reaktion mehr auslösbar.

Überlebensdauer des Zentralnervensystems: 60 Minuten.

Versuch 12.

13. VI. 1913. 6 Tage altes Kaninchen.

Äthernarkose. Operation.

11^{14} Beginn der Durchspülung mit einer Lösung von 0,9% NaCl + 0,060% $CaCl_2$ (0,118%). Das Tier erholt sich bald und macht einige Inspirationen.

11^{20} Starke Reaktion überall, Atmung.

11^{25} „ „ „ „ . Spontanbewegungen.

11^{30} Gute Reaktion.

11^{35} „ „ , noch kein Ödem.

11^{40} Auf leisen Reiz starke Reaktion.

11^{45} „ „ „ „ „ , (Das Tier reagiert lebhaft auf Anblasen.)

11^{50} Reaktion, Atmung. Kein Ödem.

11^{55} Reaktion.

12^{00} „ , Atmung noch im Gange.

12^{05} Gute Reaktion, Spontanbewegungen, Atmung.

12^{10} „ „ , das Tier atmet fortwährend.

12^{15} „ „ , am Halse tritt leichtes Ödem auf.

12^{20} „ „ , regelmäßige, langsame Atmung.

12^{25} Reaktion.

12^{30} „ .

12^{35} „ , Spontanbewegungen, Atmung noch im Gange.

12^{40} Gute Reaktion, das Ödem wird stärker.

12^{50} Reaktion.

12^{55} „ .

1^{00} Deutliche Reaktion, keine Atmung mehr.

1^{10} „ „ . .

1^{15} Schwächere Reaktion.

1^{18} Ganz schwache Reaktion.

1^{22} Keine Reaktion mehr auslösbar.

Überlebensdauer des Zentralnervensystems: 124 Minuten.

Versuch 11.

25. VI. 1913. 5 Tage alte Katze.

Äthernarkose. Operation.

10^{48} Beginn der Durchspülung mit einer Lösung von 0,9% NaCl + 0,051% $CaCl_2$ (0,1%). Das Tier wird sofort munter und bewegt sich äußerst lebhaft.

10^{55} Sehr starke Reaktion, lebhafte Spontanbewegungen, Atmung.

11^{00} Überall starke Reaktion, überaus lebhafte Spontanbewegungen mit dem ganzen Körper.

11^{05} Reaktion überall. Spontanbewegungen.

11^{10} „ auf leisen Reiz. Atmung.

11^{15} „ . Auf Anblasen Atembewegungen.

11^{20} Starke Reaktion auf leisen Reiz, lebhafte Spontanbewegungen. Kein Ödem.

11^{30} Reaktion; fortwährend Spontanbewegungen und Atmungen.

11^{45} Gute Reaktion, Atmung.

12^{00} Reaktion, Atmung.

12^{10} „ auf leisen Reiz, Spontanbewegungen, Atmung.

12^{25} Gute Reaktion, ziemlich regelmäßige Atmung.

12^{40} Reaktion, Spontanbewegungen, Atmung.

12^{50} „ „ „

1^{00} „ „ „

1^{10} Reaktion.

1^{15} Schwächere Reaktion, keine Atmung und keine Spontanbewegungen mehr.

1^{20} Reaktion nur an der vorderen Extremität.

1^{30} Schwache Reaktion.

1^{35} Undeutliche Reaktion.

1^{40} Keine Reaktion mehr auslösbar.

Überlebensdauer des Zentralnervensystems: 167 Minuten.

Aus der beigegebenen Tabelle und aus den Versuchsprotokollen kann man folgende Schlüsse ziehen.

Bei Durchströmung mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) — Versuch 1 und 2 — blieb das Zentralnervensystem nur einige Minuten lang in Tätigkeit; dann verschwand die Reflexerregbarkeit, die jedoch nach Durchspülung mit Ringer-Lösung bald wiederkehrte.

Fügte man zu dieser NaCl-Lösung noch Chlorkalium in der Menge hinzu, wie es die Ringer-Lösung enthält (0,042 % KCl) — Versuch 3 und 4 —, so wurde die Überlebensdauer des Zentralnervensystems nur um ein geringes verlängert; auch hier stellten sich auf Ringer-Durchspülung hin die Reaktionen wieder ein.

Setzte man der NaCl-Lösung dagegen Chlorcalcium zu im selben Verhältnis wie in der Ringerschen Flüssigkeit (0,024 % $CaCl_2$ [0,047 %]) — Versuch 5 —, so stieg die Überlebensdauer auf 1 Stunde und 35 Minuten an und übertraf somit den mit Ringer-Durchströmung — Versuch 6 — erzielten Wert (60 Minuten) um die Hälfte.

Es wurde dann versucht, die Wirkung der Ringer-Lösung durch vermehrten Chlorcalciumzusatz günstiger zu gestalten, und es wurde hierdurch tatsächlich eine Verlängerung des Überlebens des Zentralnervensystems gegenüber der Lebensdauer bei Durchspülung mit gewöhnlichem Ringer erzielt — Versuche 7 und 8. Das Chlorcalcium vermindert ohne Zweifel die schädliche Wirkung des Kaliums; denn mit der Vergrößerung der Calciumdosis wuchs auch die Lebensdauer des Zentralnervensystems. Wurde dagegen die Chlorkaliummenge vermehrt — Versuch 9 —, so sank die Überlebenszeit beträchtlich herab. Bei diesem letzten Versuch ließ sich durch Perfusion mit gewöhnlichem Ringer die Reflexerregbarkeit nicht wieder herstellen, also mußte die vermehrte Kaliummenge eine starke, dauernde Schädigung der Zellen herbeigeführt haben.

Das günstigste Resultat hatten bisher die Versuche ergeben, die mit Lösungen angestellt wurden, die nur Kochsalz und Chlorcalcium (im selben Verhältnis wie im Ringer) enthielten — Versuch 5 —; dagegen hatte sich jeder Chlorkaliumzusatz als überaus schädlich erwiesen. Es wurde deshalb bei den folgenden Versuchen (Versuche 10 und 11) die Chlorcalciummenge noch gesteigert, während die NaCl-Dosis unverändert blieb. Eine Kochsalzlösung, die etwas über die doppelte Menge $CaCl_2$ enthielt wie Ringersche Flüssigkeit, nämlich 0,9% NaCl und 0,05% bis 0,06% $CaCl_2$ (Versuch 10 bis 12), vermochte zwei Kaninchen über 2 Stunden und eine junge Katze 2 Stunden und 47 Minuten lang am Leben zu erhalten; und zwar waren, wie das Protokoll des Versuches 11 zeigt, noch nach mehr als 2 Stunden die Reaktionen selbst auf ganz leisen Reiz recht kräftig, das Tier machte auch Spontanbewegungen, und die Atmung war im Gange. Die eben angegebene Chlorcalciummenge (0,05%) stellt annähernd das Optimum dar; wurde sie noch vergrößert, so nahm die Überlebensdauer des Zentralnervensystems mit steigender Dosis rasch ab — Versuch 13.

Es wurden dann noch Versuche vorgenommen, bei denen die Kochsalzmenge verringert und die Isotonie der Lösungen durch entsprechend vermehrten Chlorcalciumzusatz annähernd aufrechterhalten werden sollte — Versuche 14 und 15. Bei diesen Versuchen wurde jedoch versehentlich bei der Berech-

nung der notwendigen Calciummenge der Krystallwassergehalt nicht berücksichtigt, so daß in den Lösungen dieser Versuchsreihe zu wenig $CaCl_2$ enthalten war, und die Durchströmungsflüssigkeiten daher hypotonisch waren; wir müssen diese Experimente deshalb mit unter den folgenden Abschnitt einreihen. Doch zeigt die sehr geringe Lebensdauer in Versuch 15 deutlich, daß ein Ersatz eines größeren Teiles des NaCl durch $CaCl_2$ stark schädigend wirkt.

Um endlich die Wirkungsweise anisotonischer Lösungen festzustellen, wurden einige Tiere mit hypotonischen und hypertonischen Flüssigkeiten durchspült — Versuche 16 und 17 —, wobei klar hervortrat, daß hypotonische Lösungen bei weitem weniger schädigen als hypertonische. Dies Resultat stimmt durchaus mit den Beobachtungen Baglionis[1]) und einer Angabe von v. Frey[2]) überein.

Überblickt man die eben mitgeteilten Versuchsergebnisse, so fällt vor allem auf, daß sie im Widerspruch zu der oben kurz besprochenen Theorie von Jacques Loeb[3]) stehen, nach der das Zusammenwirken von Natrium-, Calcium- und Kalium-Ionen nötig sein soll, um die Funktion der Zelle zu erhalten. Bei allen unseren Versuchen zeigte sich ganz klar, daß jeglicher Kaliumzusatz schädlich war, und daß keine andere Durchströmungsflüssigkeit so gute Resultate aufzuweisen hatte wie eine Lösung, die 0,9 % NaCl und 0,05 % $CaCl_2$ (0,1 %) enthielt, also mehr als doppelt so viel Chlorkalium wie Ringersche und Lockesche Lösung.

Die außerordentliche Bedeutung, die gerade das Calcium für die Funktion des Zentralnervensystems haben muß, wird besonders deutlich, wenn man bedenkt, daß ein junges Säugetier bei Durchspülung mit einer 0,9 %igen NaCl-Lösung nur 3 Minuten lang reagiert, fügt man die kleine Menge von 0,05 % $CaCl_2$ hinzu, so kann die Reflexerregbarkeit 2 bis nahezu 3 Stunden lang erhalten bleiben.

Es zeigte sich aber auch bei unseren Versuchen, daß der

---

1) Baglioni, a. a. O.

2) v. Frey, Die Erregbarkeit von Muskeln und Nerven unter dem Einfluß verschiedenen Wassergehalts. Sitzungsber. d. physikal.-med. Gesellsch. zu Würzburg 1908.

3) Jacques Loeb, a. a. O.

$CaCl_2$-Zusatz eine bestimmte Grenze (ca. 0,05 %) nicht weit überschreiten darf, weil das Calcium sonst lähmend wirkt. Vergleiche die Angaben von O. Langendorff[1]), Hamburger[2]) u. a.

Ferner wird aus unseren Versuchen deutlich, daß Calcium die schädigende Wirkung des Kaliums herabsetzt.

Als besonders bemerkenswertes Resultat unserer Experimente muß die völlige Entbehrlichkeit des Kaliums hervorgehoben werden, sowie seine Schädlichkeit bereits in den geringen Mengen, in denen es im Blutserum vorhanden ist. Diese letztere Tatsache weist wohl darauf hin, daß das Kalium im Blute in einer Form vorhanden ist, in der diese nachteiligen Wirkungen in Fortfall kommen.

2. Die Ersetzbarkeit des Calciums.

Nachdem sich diese Wichtigkeit des Calciums für die Tätigkeit des Zentralnervensystems herausgestellt hatte, war nun zu untersuchen, ob vielleicht irgendein anderes Ion an seine Stelle treten kann. Es wurde bei den folgenden Versuchen von der Lösung ausgegangen, die bisher als die vorteilhafteste erprobt worden war, einer Lösung von 0,9 % NaCl + 0,05 % $CaCl_2$; in dieser wurde das Chlorcalcium durch äquivalente Mengen des zu untersuchenden Stoffes ersetzt.

Wir beschränkten uns darauf, in dieser Hinsicht die Wirkung von Barium, Strontium und Magnesium zu untersuchen.

Ehe wir unsere Ergebnisse mitteilen, wollen wir wieder einen kurzen Blick auf die Literatur werfen.

Über die physiologische Wirkung des Bariums und Strontiums berichten nur wenige Arbeiten. Bezüglich des Strontiums stimmen die Meinungen der Autoren darin überein, daß es die Erregbarkeit der Nerven steigere und in ähnlicher Weise wie das Calcium ein wirksamer Antagonist des Kaliums sei. Grützner[3]), Overton[4]) und Mines[5]) stellten dies bei Versuchen am peripheren Nerven des Frosches fest.

Dieselben Eigenschaften schreiben Grützner[3]) und Mines[5])

---

[1]) O. Langendorff, a. a. O.
[2]) H. J. Hamburger, a. a. O.
[3]) Grützner, a. a. O.
[4]) Overton, a. a. O.
[5]) Mines, a. a. O.

auch dem Barium zu, während Overton[1]) nicht konstatieren konnte, daß die schädigende Wirkung des Kaliums durch $BaCl_2$ aufgehoben wurde. Dies ist ja auch nicht verwunderlich, da Bariumchlorid selbst als giftig bekannt ist.

Über den Einfluß der Magnesiumsalze (vor allem $MgCl_2$ und $MgSO_4$) auf den Organismus herrscht unter den Physiologen eine völlig einheitliche Ansicht. Sie wirken lähmend, narkotisierend auf den tierischen Organismus, und zwar primär lähmend; jedes Anzeichen einer vorübergehenden Erregung, wie sie bei anderen gleichfalls schädigenden Salzen beobachtet wird, fehlt. Als wirksamster Antagonist des Magnesiums wird wiederum Calcium hingestellt. Diese Erfahrungen beruhen besonders auf Untersuchungen von Meltzer und Auer[2, 3]), die Injektionsversuche an Kaninchen anstellten, ferner von Bethe[4]), der die Wirkung der im Seewasser enthaltenen Salze auf die rhythmischen Bewegungen der Medusen beobachtete, und von Polimanti[5]), der u. a. auch den Einfluß der Magnesium-Ionen auf die Pulsationen des Herzens von Maja verrucosa untersuchte. Endlich gibt auch Bardier[6]) eine kurareartige Wirkung der Magnesiumsalze auf das periphere Nervensystem des Frosches an.

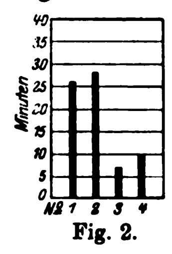


Fig. 2.

Anhangsweise sei hier erwähnt, daß Buglia[7]), der mit quer gestreiften und glatten Muskeln von Warmblütern experimentierte, mit Rubidium und Caesium enthaltenden Lösungen nicht viel Erfolg hatte. Jedenfalls sind diese nicht imstande, das Calcium zu ersetzen.

---

[1]) Overton, a. a. O.

[2]) Meltzer und Auer, Physiological and pharmakological Studies on magnesium Salts. Americ. Journ. of Physiol. 14, 366, 1905.

[3]) Meltzer und Auer, Über die Beziehungen des Calciums zu den Hemmungswirkungen des Magnesiums bei Tieren. Centralbl. f. Physiol. 1907, 788.

[4]) Bethe, a. a. O.

[5]) O. Polimanti, Beiträge zur Physiologie von Maja verrucosa. Arch. f. (Anat. und) Physiol. 1913, 195.

[6]) Bardier, Les sels du magnésium et le système nerveux moteur périphérique. Journ. de physiol. et path. générale 9, 611, 1907.

[7]) G. Buglia, Über die Ersetzbarkeit des Calciums in den sog. „physiologischen Flüssigkeiten". Zeitschr. f. Biol. 54, 343, 1911.

Der Besprechung unserer Resultate lassen wir wieder eine Tabelle der Versuche vorausgehen (Fg. 2).

Diese Versuche wurden mit neugeborenen Kaninchen ausgeführt.

Zusammensetzung der Durchspülungsflüssigkeit.

Versuch 1.	0,9 % $NaCl + 0{,}19\ BaCl_2$	(krystallwasserhaltig).
„ 2.	0,9 % $NaCl + 0{,}12\ SrCl_2$	„
„ 3.	0,9 % $NaCl + 0{,}17\ MgCl_2$	„
„ 4.	0,9 % $NaCl + 0{,}17\ MgCl_2$	„

Wir sehen aus der Kürze der Überlebensdauer, daß weder Barium (Versuch 1), noch Strontium (Versuch 2) oder Magnesium (Versuch 3 und 4) auch nur annähernd die physiologische Funktion des Calciums ersetzen können. Im einzelnen betrachtet sind aber die Schädigungen, die das Zentralnervensystem durch jedes dieser Ionen erleidet, ganz verschieden.

Sehen wir uns zunächst einmal das Protokoll eines Versuches mit einer Barium-Chlornatriumlösung an.

Versuch 20.

10. VII. 1913. Zirka 4 Tage altes Kaninchen.
Äthernarkose. Operation.

11^{50}	Beginn der Durchspülung mit einer Lösung von 0,9 % $NaCl + 0{,}19$ % $BaCl_2$. Das Tier gerät sofort in heftigen Erregungszustand, es zappelt, macht krampfhafte Atembewegungen, Schaum tritt vor die Schnauze.
12^{05}	Gute Reaktion überall, Atmung.
12^{10}	„ „ „ „
12^{15}	Die Reaktionen werden schwächer, vereinzelte Atembewegungen.
12^{20}	Schwache Reaktion, Ödem am Halse.
12^{25}	Undeutliche Reaktion, starkes Ödem.
12^{27}	Durchspülung mit einer Lösung von 0,9 % $NaCl + 0{,}05$ % $CaCl_2$ (0,1 %).
12^{30}	Keine Reaktion.
12^{35}	„ „
12^{40}	„ „

Überlebensdauer des Zentralnervensystems: 26 Minuten.

Hieraus erhellt, daß das Barium durchaus schädlich für den tierischen Organismus ist, insonderheit für das Zentralnervensystem, und zwar ist die Alteration so stark, daß ein Wiederbeleben mit einer Lösung, die statt des Bariums die entsprechende Menge Calcium enthält, nicht möglich ist.

Wenden wir uns jetzt einem Versuche zu, in dem das Calcium durch Strontium ersetzt ist.

Versuch 22.

12. VII. 1913. Zirka 6 Tage altes Kaninchen.
Äthernarkose. Operation.

10^{28} Beginn der Durchspülung mit einer Lösung von
$0{,}9\,\%$ NaCl + $0{,}12\,\%$ $SrCl_2$.
Einige Atembewegungen.
10^{30} Reaktion, Atmung.
10^{35} „ „ , schwache Spontanbewegungen.
10^{40} Reaktion.
10^{45} Schwache Reaktion, zitternde Bewegungen mit der vorderen Extremität.
10^{50} Das Tier reagiert mit krampfartigen Streckbewegungen der Extremitäten.
10^{55} Ganz undeutliche Reaktion, beginnendes Ödem.

10^{56} Durchspülung mit einer Lösung von
$0{,}9\,\%$ NaCl + $0{,}05\,\%$ $CaCl_2$ ($0{,}1\,\%$).
Mehrere Atembewegungen.
11^{00} Reaktion, Atmung.
11^{05} „ auch auf leisen Reiz, Spontanbewegungen.
11^{10} Lebhafte Reaktion, Atmung.
11^{18} Gute Reaktion, Spontanbewegungen.

11^{19} Durchspülung mit $0{,}9\,\%$ NaCl + $0{,}12\,\%$ $SrCl_2$.
11^{20} Reaktion, ruckweise Spontanbewegungen.
11^{25} Schwache Reaktion.
11^{28} Keine Reaktion.

11^{29} Durchspülung mit $0{,}9\,\%$ NaCl + $0{,}05\,\%$ $CaCl_2$ ($0{,}1\,\%$).
11^{35} Keine Reaktion.
11^{40} „ „
11^{45} „ „
Überlebensdauer des Zentralnervensystems bei Durchspülung mit $0{,}9\,\%$ NaCl + $0{,}12\,\%$ $SrCl_2$: 27 Minuten.

Auch hier verschwand ungefähr ebenso schnell wie bei dem Versuch mit der Barium-Lösung die Reflexerregbarkeit. Aber im Gegensatz dazu ist hier eine Wiederbelebung der Nervenzentren mit der NaCl-$CaCl_2$-Lösung möglich, also muß die Schädigung des Zentralnervensystems durch das Strontium weniger eingreifend sein als die durch Barium.

Schließlich müssen wir noch einen Versuch mit einer magnesiumhaltigen Perfusionsflüssigkeit betrachten.

Versuch 21.

11. VII. 1913. Zirka 5 Tage altes Kaninchen.
Äthernarkose. Operation.

11^{27} Beginn der Durchspülung mit einer Lösung von
0,9 % NaCl + 0,17 % $MgCl_2$.
Das Tier macht schwache Bewegungen, klappert mit den Zähnen.
11^{31} Schwache Reaktion.
11^{32} " "
11^{33} Undeutliche Reaktion.

11^{34} Durchspülung mit 0,9 % NaCl + 0,05 % $CaCl_2$ (0,1 %). Das Tier erholt sich.
11^{38} Gute Reaktion.
11^{41} " " , Spontanbewegungen.
11^{45} Das Tier hat sich vollkommen erholt und reagiert lebhaft.

11^{47} Durchspülung mit 0,9 % NaCl + 0,17 % $MgCl_2$.
11^{50} Schwache Reaktion, einige spontane Atmungen.
11^{56} Ganz schwache Reaktion.
11^{57} Undeutliche Reaktion.
11^{59} Keine Reaktion.

12^{00} Durchspülung mit 0,9 % NaCl + 0,05 % $CaCl_2$ (0,1 %). Schwache Spontanbewegungen.
12^{03} Schwache Reaktion.
12^{06} Gute Reaktion, Spontanbewegungen.
12^{10} " "
12^{13} Das Tier hat sich völlig erholt und reagiert lebhaft.

12^{15} Durchspülung mit 0,9 % NaCl + 0,17 % $MgCl_2$.
12^{18} Schwache Reaktion.
12^{20} Minimale "
12^{22} Keine Reaktion auslösbar.

12^{23} Durchspülung mit 0,9 % NaCl + 0,05 % $CaCl_2$ (0,1 %).
12^{25} Keine Reaktion.
12^{30} Schwache Reaktion.
12^{33} Deutliche "
Überlebensdauer des Zentralnervensystems bei Durchspülung mit 0,9 % NaCl + 0,17 % $MgCl_2$: 6 Minuten.

Dieser Versuch zeigt sehr schön, daß Magnesium auf das Zentralnervensystem ganz ähnlich wie ein Narkoticum wirkt. Das mit Magnesium narkotisierte Tier ließ sich immer wieder mit der NaCl-$CaCl_2$-Lösung erwecken. Eine erhebliche, dauernde Schädigung scheint das Zentralnervensystem durch das Magnesium nicht davonzutragen.

Im großen und ganzen stimmen also die Ergebnisse dieser Versuchsreihe mit den Resultaten der oben erwähnten Autoren überein, die ihre Versuche an anderen Organen vornahmen.

Anhang: Die Ersetzbarkeit des Natriums.

In einem Versuche wurde das Natrium durch die äquimolekulare Menge Lithium ersetzt und ein neugeborenes Kaninchen mit einer Lösung durchspült, die 0,65 % LiCl und 0,05 % $CaCl_2$ enthielt. Die Lebensdauer betrug nur 26 Minuten. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit der Angabe von Baglioni[1]), daß Lithium nicht imstande sei, das Natrium in seiner Wirkung auf die Nervenzentren zu ersetzen.

B. Versuche an älteren Säugetieren.

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß für die Funktion des Zentralnervensystems neugeborener Säugetiere von allen untersuchten Lösungen diejenige am geeignetsten war, die 0,9 % NaCl und 0,05 % $CaCl_2$ enthielt, galt es jetzt zu ermitteln, ob dies auch für den erwachsenen Organismus zutrifft.

Bei diesen Versuchen beschränkten wir uns im allgemeinen auf einen Vergleich zwischen der Ringer-, Tyrode- und der von uns angegebenen Lösung.

Die Wahl der Versuchstiere machte einige Schwierigkeiten, da erwachsene Tiere eben viel ungünstigere Resultate ergeben als neugeborene. Mit Meerschweinchen, die vor dem Versuch bis auf die Temperatur der Lösung abgekühlt wurden, konnten keine so guten Resultate erzielt werden, wie sie H. W. Langendorff[2]) erhielt. Immerhin lassen sich auch die mit Meerschweinchen erzielten Ergebnisse verwerten. Als wirklich geeignete Versuchsobjekte erwiesen sich Igel, die noch nicht völlig im Winterschlafe waren; auch Herlitzka[3]) hat sie mit gutem Erfolge bei Durchspülungsversuchen verwendet.

---

[1]) Baglioni, a. a. O.
[2]) H. W. Langendorff, a. a. O.
[3]) A. Herlitzka, a. a. O.

1. Versuche an Meerschweinchen.

Zusammensetzung der Durchspülungsflüssigkeit.

Versuch 1, 2. Tyrode-Lösung ohne Traubenzucker.

0,8 % NaCl,
0,02 % KCl,
0,02 % $CaCl_2$,
0,01 % $MgCl_2$,
0,005 % NaH_2PO_4,
0,1 % $NaHCO_3$.

Diese Zusammensetzung wurde einer Arbeit von Rona und Neukirch[1]), die Tyrode-Lösung bei Versuchen am überlebenden Darm und Herzen mit gutem Erfolge verwendeten, entnommen. Nur der Traubenzucker wurde weggelassen, da unsere Untersuchungen sich ja auf die Wirksamkeit der anorganischen Bestandteile beschränkten.

Versuche 3, 4. Ringer-Lösung.

0,9 % NaCl,
0,042 % KCl,
0,024 % $CaCl_2$.

Versuche 5 bis 9. Die von uns angegebene Lösung.

0,9 % NaCl + 0,05 % $CaCl_2$.

Versuch 10. 0,9 % NaCl + 0,1 % $CaCl_2$.

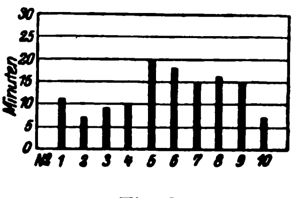


Fig. 8.

Zwar war die Überlebensdauer des Zentralnervensystems bei allen diesen Versuchen recht gering, es ist aber doch deutlich sichtbar, daß die mit Ringer- (Versuche 3, 4) und Tyrode-Lösung (Versuche 1, 2) durchströmten Tiere bei weitem nicht so lange reagierten wie die mit unserer Lösung durchspülten (Versuch 5 bis 9).

Ein Versuch mit vermehrtem Calciumzusatz (Versuch 10) zeigte auch hier eine erhebliche Schädigung des Zentralnervensystems.

Die Resultate dieser Versuchsreihe stimmen vollkommen mit den an neugeborenen Tieren gewonnenen überein.

---

[1]) P. Rona und P. Neukirch, Experimentelle Beiträge zur Physiologie des Darmes. III. Arch. f. d. ges. Physiol. 148, 273, 1912.

2. Versuche an Igeln.

Durchspülungsflüssigkeit.

Versuch 1. 0,9 % NaCl + 0,05 % $CaCl_2$ + 0,1 % $NaHCO_3$ + 0,005 % NaH_2PO_4.

„ 2. Tyrode-Lösung ohne Traubenzucker (s. o.).

„ 3 bis 5. Ringer-Lösung (s. o.).

„ 6 „ 7. 0,9 % NaCl + 0,05 % $CaCl_2$ + ca. 3 Vol.-% Kohlensäure.

„ 8 „ 11. 0,9 % NaCl + 0,05 % $CaCl_2$.

Aus dieser Versuchsreihe geht einwandfrei hervor, daß das Zentralnervensystem erwachsener Igel, die mit unserer Lösung durchspült wurden, länger am Leben erhalten wurde als das der mit Ringer- oder Tyrode-Lösung durchströmten Tiere. Zwar ist hier der Unterschied nicht so auffallend wie bei den neugeborenen Versuchstieren, er ist aber doch ganz deutlich, da die Lebensdauer im Durchschnitt um die Hälfte länger war.

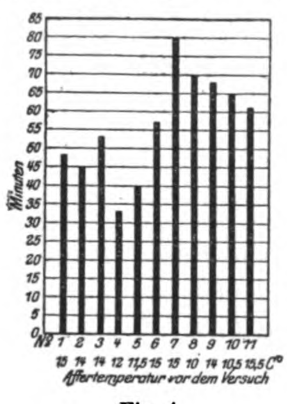


Fig. 4.

Es muß übrigens noch erwähnt werden, daß die Durchspülung mit unserer Lösung nicht nur hinsichtlich der Überlebensdauer der Ringer- und Tyrode-Durchströmung überlegen war, sondern daß es auch einige Male mit ihr gelang, die bei einem mit Ringer- bzw. Tyrode-Lösung durchströmten Tier bereits erloschene Reflexerregbarkeit wieder anzufachen. Eine Umkehrung dieses Versuchs ergab ein negatives Resultat. Dies ist aus folgenden drei Versuchsprotokollen ersichtlich.

Versuch 56.

21. XI. 1913. Mittelgroßer Igel.

Aftertemperatur vor dem Versuch 12,0°.

Äthernarkose. Operation.

10^{37}	Beginn der Durchspülung mit Ringer. Das Tier erholt sich sofort.
10^{40}	Reaktion überall.
10^{45}	„ „
10^{50}	„ „
10^{55}	„ „

11^{00} Noch gute Reaktion.
11^{05} Reaktion.
11^{10} Die Reaktionen werden schwächer.
11^{15} Nur noch undeutliche Reaktion.

11^{16} Durchspülung mit 0,9% NaCl + 0,05% $CaCl_2$.
11^{20} Keine Reaktion.
11^{25} Keine Reaktion, spontane Atmung.
11^{30} Schwache Reaktion.
11^{35} Bessere Reaktion überall!
11^{40} Gute Reaktion überall.
11^{45} „ „ „
11^{50} „ „ „
Überlebensdauer des Zentralnervensystems bei Ringer-Durchspülung: 38 Minuten.

Versuch 58.

26. XI. 1913. Mittelgroßer Igel.
Aftertemperatur vor dem Versuch 14,0°.
Äthernarkose. Operation.

10^{30} Beginn der Durchspülung mit Tyrode-Lösung ohne Traubenzucker. Das Tier erholt sich sofort.
10^{35} Sehr starke Reaktion und heftige Spontanbewegungen.
10^{40} Starke Reaktion.
10^{45} „ „
10^{50} „ „
10^{55} Die Reaktionen werden schwächer.
11^{00} Reaktion.
11^{05} „
11^{10} Schwächere Reaktion.
11^{15} Nur noch am Kopf auf starken Reiz schwache Reaktion.
11^{20} Keine deutliche Reaktion mehr auslösbar.

11^{22} Durchspülung mit 0,9% NaCl + 0,05% $CaCl_2$.
11^{25} Undeutliche Reaktion.
11^{28} Bessere Reaktion.
11^{30} Gute Reaktion.
11^{35} Gute Reaktion.
11^{40} „ „
11^{50} Die Reaktionen werden schwächer.
Überlebensdauer bei Tyrode-Durchspülung: 45 Minuten.

Versuch 54.

18. XI. 1913. Mittelgroßer Igel.
Aftertemperatur vor dem Versuch 14,0°.
Äthernarkose. Operation.

10^{22} Beginn der Durchspülung mit einer Lösung von 0,9% NaCl + 0,05% $CaCl_2$.

10^{25} Reaktion überall.
10^{30} „ „ , Spontanbewegungen.
10^{35} „ „ , Atmung.
10^{40} Gute Reaktion überall, tiefe Atembewegungen.
10^{45} „ „ , Atmung.
10^{50} „ „ , „
11^{00} „ „ , „
11^{05} „ „ , „
11^{10} „ „ , „
11^{15} Überall noch deutliche Reaktion.
11^{20} Besonders am Kopf starke Reaktion.
11^{25} Schwächerwerden der Reaktionen.
11^{28} Am Kopf noch Reaktion, Atmung.
11^{30} Auf Reiz tiefe Atmung, bald darauf spontane Atmung.

11^{31} Durchspülung mit **Ringer**.
11^{35} Keine Reaktion auslösbar.
11^{45} „ „ „

Überlebensdauer bei Durchspülung mit 0,9 % NaCl + 0,05 % $CaCl_2$: 68 Minuten.

Im Anschluß hieran wurden einige Versuche über die **Wirkung der Kohlensäure** angestellt (Versuch 6 und 7). Die Kohlensäure wurde im Kippschen Apparat dargestellt; je einem Liter der Perfusionsflüssigkeit wurden 30 ccm der gleichen, aber mit Kohlensäure gesättigten Lösung zugesetzt, so daß die Durchspülungsflüssigkeit ca. 3 Vol.-% Kohlensäure enthielt, da der Absorptionskoeffizient bei Zimmertemperatur etwa gleich 1 ist.

Die Kohlensäure übte auf das Atemzentrum einen starken Reiz aus; langandauernde und tiefe Atembewegungen waren die Folge. Aber auch sonst wurde hierdurch die Reflexerregbarkeit augenscheinlich etwas gesteigert, dagegen übte die Kohlensäure keinen deutlichen Einfluß auf die Überlebensdauer aus.

Schließlich wurde noch ein Versuch vorgenommen, bei dem der von uns angegebenen Lösung noch Natriumbicarbonat und Natriumphosphat im selben Verhältnis wie in der Tyrode-Lösung zugesetzt wurde (Versuch 1). Auf diese Weise wird die natürliche Reaktion des Blutes hergestellt, was nach einigen Autoren von Wichtigkeit sein soll. — Wir sahen keinen Vorteil davon.

Auch diese letzten Versuche bestätigten das gewonnene Resultat: **Eine Lösung, die 0,9 % NaCl und 0,05 $CaCl_2$**

enthält, hat sich als die brauchbarste erwiesen, um das Zentralnervensystem von Säugetieren überlebend zu erhalten. An dieser Stelle sei erwähnt, daß die Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung dieser Lösung $\Delta = -0{,}52$ ergab; sie ist also gegenüber dem Blute ($\Delta = -0{,}56$) ein wenig hypotonisch.

Es ist aber sicher, daß unsere Lösung bei Versuchen mit anderen Organen nicht so gute Resultate gibt wie gerade bei dem Zentralnervensystem, in dessen Stoffwechsel eben das Calcium eine ganz besonders wichtige und das Kalium eine geringe Rolle spielen muß. Das geht z. B. für das Herz schon aus den oben zitierten Arbeiten von Ringer, Locke und Langendorff hervor.

C. Beiläufige Ergebnisse.

1. Narkose. Wie oben erwähnt, wurde fast bei allen Versuchen Äthernarkose angewendet. Hierbei zeigte sich bei den neugeborenen Tieren eine merkwürdige Widerstandskraft gegen das Narkoticum, eine Tatsache, die schon von H. Winterstein[1]) beobachtet wurde. Es war deutlich zu sehen, daß mit zunehmendem Alter die zur Narkose erforderliche Zeit fast in ganz regelmäßiger Weise abnahm.

2. Ödem. Bei allen Durchströmungsversuchen ist die Ödembildung ein sehr störender Faktor. Nun soll nach den Angaben von Chiari und Januschke[2]) die Anreicherung von Calciumsalzen im Körper die Transsudat- und Exsudatbildung hemmen. Unsere Versuche bestätigen dies. Bei Durchspülung mit unserer Lösung, die verhältnismäßig kalkreich ist (0,05 % $CaCl_2$), trat erst viel später ein geringes Ödem auf als bei Durchspülung mit Ringerscher Flüssigkeit, die noch nicht halb so viel Calcium enthält (0,024 % $CaCl_2$).

Bei einer Reihe von Sektionen, die nach langen Durchströmungen gemacht wurden, stellte sich übereinstimmend heraus, daß eine Ödembildung hauptsächlich in den drüsigen Organen, wie Pankreas, Schilddrüse und Darmschleimhaut statthatte, während Muskelgewebe und Zentralnervensystem fast ganz frei blieben.

---

[1]) H. Winterstein, a. a. O.

[2]) Chiari und Januschke, Hemmung von Transsudat- und Exsudatbildung durch Calciumsalze. Wiener klin. Wochenschr. 1910, 427.

Da nach Gradinescu[1]) das Adrenalin den Eintritt des Ödems verhindern soll, wie er bei Durchströmung des Nerv-Muskelpräparates feststellte, setzten wir bei einigen Versuchen der Durchspülungsflüssigkeit Adrenalin zu in Mengen von 1:20000 und 1:125000. Es trat tatsächlich kein deutliches Ödem ein, dagegen zeigte sich, daß selbst ein geringer Adrenalinzusatz eine stark schädigende Wirkung auf das Zentralnervensystem ausübte, die jede Verwendung des Stoffes für Durchspülungsversuche verbietet. Die ungünstige Wirkung auf die Reflexerregbarkeit hat Lussana[2]) schon bei einer Adrenalinmenge von 1:200000 beobachtet; und zwar hält er sie für eine spezifische Wirkung des Adrenalins, nicht für die Folge einer durch die Gefäßcontraction bedingten Asphyxie.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Natrium- und Calciumsalze sind für sich allein imstande, das Zentralnervensystem der Säugetiere überlebend zu erhalten.

2. Schon geringer Kaliumzusatz wirkt schädigend.

3. Calcium und Natrium sind durch kein anderes Ion ersetzbar.

4. Als brauchbarste anorganische Durchspülungsflüssigkeit für das überlebende Zentralnervensystem wird eine Lösung von 0,9% NaCl und ca. 0,05% $CaCl_2$ (krystallwasserfrei) gefunden. Diese Lösung gibt bessere Resultate als Ringer- und Tyrode-Lösung; mit ihr gelingt es, das Zentralnervensystem neugeborener Säugetiere zwei bis nahezu drei Stunden lang am Leben zu erhalten, dasjenige von erwachsenen Winterschläfern länger als eine Stunde.

Es sei mir gestattet, auch an dieser Stelle Herrn Professor Dr. H. Winterstein meinen herzlichen Dank abzustatten für die Anregung zu dieser Arbeit und das freundliche Interesse, das er ihrem Entstehen entgegengebracht hat.

---

[1]) A. V. Gradinescu, Der Einfluß der Nebennieren auf den Blutkreislauf und den Stoffwechsel. Arch. f. d. ges. Physiol. **152**, 187, 1913.

[2]) F. Lussana, Action de l'adrénaline et de la choline sur les réflexes de la moelle épinière chez la tortue. Arch. intern. de physiol. **12**, 119, 1912.

Über die Bestimmung kleiner Bleimengen.

I. Mitteilung.

Von

M. Siegfried und W. Pozzi.

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 6. März 1914.)

Zur Bestimmung sehr kleiner Bleimengen, insbesondere in Leitungswässern, wird vielfach eine Schätzungsmethode angewandt, die auf dem Vergleiche der durch Schwefelwasserstoffwasser oder Natriumsulfid und Essigsäure, zum Teil unter Beigabe von Salzen erzeugten Schwarzbraunfärbung mit der auf gleiche Weise in Lösungen von Bleisalzen von bekanntem Gehalte hervorgerufenen beruht. Es wird dabei in der Regel so verfahren, daß die Vergleichslösung durch allmählichen Zusatz einer Bleinitratlösung aus einer Bürette auf gleiche Intensität gebracht wird. Daneben steht die exakte Methode von Diehl und Topf zur Verfügung, die von Kühn[1]) im Kaiserl. Gesundheitsamte speziell für die Bestimmung in Leitungswässern ausgearbeitet worden ist.

Diese Methode, von deren Genauigkeit auch wir uns überzeugt haben, läßt die Bestimmung sehr geringer Bleimengen, unter 1 mg, kaum zu und erfordert viel Zeit. Mehr als zwei Bestimmungen haben wir ebenso wie Kühn an einem Tage nicht erledigen können.

Um in den Besitz einer schnell ausführbaren Methode der Bestimmung sehr kleiner Bleimengen, 0,1 mg und weniger, insbesondere in Leitungswässern, tierischen Organen und Flüssig-

---

[1]) B. Kühn, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 23, 389, 1905.

keiten zu gelangen, bestrebten wir uns, die genannte Schätzungsmethode zu einer brauchbaren Methode zu gestalten.

Wir geben jetzt nur die Methode mit der nötigen Begründung an und werden später ausführlich über ihre Entwickelung berichten; ebenso können wir erst später über ihre Anwendung auf die Bestimmung von Blei in tierischen Organen und Flüssigkeiten Mitteilung machen.

Ein in der Literatur bekannter Fehler des erwähnten Schätzungsverfahrens, namentlich bei der Anwendung auf Leitungswässer, wird durch die Gegenwart von Eisen hervorgerufen. Auch bei Gegenwart von größeren Mengen Essigsäure wird dasselbe zum Teil mitgefällt und vergrößert so die Bleiwerte. Nimmt man Salzsäure anstatt Essigsäure, so wird mehr oder weniger Bleisulfid gelöst. Einen zweiten Fehler erkannten wir, als wir Bleilösungen von bekanntem Gehalte bei Abwesenheit von Eisen in dem Colorimeter nach Duboscq nach Zusatz von Natriumsulfid und Essigsäure bzw. Schwefelwasserstoff untersuchten. Das Bleisulfid ist nicht vollständig kolloid gelöst und bleibt vor allem nicht völlig gelöst, sondern flockt zum Teil aus. Selbstverständlich kann man deshalb keine genauen Werte durch colorimetrische Messungen erhalten, wovon wir uns genügend überzeugen konnten.

Diesen zweiten Fehler haben wir durch Anwendung eines Schutzkolloides beseitigt. Durch Zusatz von Gummi arabicum gelingt es, die Ausflockung zu vermeiden. Man erhält so gleichmäßige braune Lösungen.

Den ersten Fehler, den die Gegenwart von Eisen verursacht, eliminierten wir, indem wir anstatt der größeren Menge Essigsäure sehr kleine Mengen Salzsäure nahmen. Durch Ausprobieren fanden wir, daß bei einer Konzentration von zirka $^{n}/_{1000}$-Salzsäure unter den gegebenen Bedingungen die durch das kolloidale Bleisulfid erzeugte Braunfärbung nicht beeinflußt wird, und daß die Gegenwart von Eisen nicht schadet.

Ehe wir die Methode beschreiben, möchten wir über eine Beobachtung berichten, vor allem um zu warnen, die Methode schon jetzt vor unserer in Aussicht gestellten weiteren Mitteilung auf die Bestimmung von Blei in tierischen Flüssigkeiten und Organen anzuwenden. Dampft man Lösungen von bekanntem Bleigehalte von den hier in Betracht kommenden

Konzentrationen mit Salpetersäure ein, löst den Rückstand und führt dann die Bleibestimmung aus, so erhält man zu niedrige Werte. Die Differenzen sind bei Verwendung von 20 ccm Salpetersäure schon sehr beträchtliche. Wir haben mit einer größeren Anzahl von Präparaten der verschiedensten Bezugsquellen Versuche ausgeführt und nur ein Salpetersäurepräparat gefunden, das keinen Fehler verursachte. Der Fehler, der beim Eindampfen mit Salpetersäure entsteht, beruht auf der Bildung eines unlöslichen Salzes. Man beobachtet in den Lösungen, die aus den Rückständen der mit Salpetersäure eingedampften Bleinitratlösungen hergestellt sind, ungelöste Partikeln. Es ist an ein Bleisilicat zu denken; Salpetersäure löst aus Glas etwas Kieselsäure, beim Erhitzen schnell, bei gewöhnlicher Temperatur langsam. Über die Natur der unlöslichen Bleiverbindung und über Vermeidung des Fehlers in den Fällen, in denen die Anwendung der Salpetersäure nötig ist, werden wir später berichten.

Der Fehler, den die Verwendung von Salpetersäure verursacht, tritt selbstverständlich nicht nur bei unserer Methode hervor, sondern auch bei anderen, auch solchen, bei denen wesentlich größere Mengen Blei bestimmt werden. Je geringer die Mengen Blei sind, um so mehr macht er sich bei dem gleichen Volumen Salpetersäure geltend, und natürlich um so mehr, je größere Mengen Salpetersäure in Anwendung kommen. So haben wir auch bei Benutzung der genannten Kühn'schen Methode nach Eindampfen mit Salpetersäure wesentlich zu geringe Bleiwerte erhalten.

Die Methode.

Wir benutzen das Colorimeter nach Duboscq von A. Krüss in Hamburg, das ja für die Kreatininbestimmungen nach Folin in den meisten Laboratorien vorhanden ist, aber nicht den von derselben Firma hergestellten Beleuchtungsapparat, dessen Zweck die Erzeugung einer vollständig gleichmäßigen Beleuchtung der beiden Hälften des Gesichtsfeldes ist, sondern: das Colorimeter ist in einem schwarz ausgeschlagenen Kasten (23 × 43 × 28 cm) montiert, vor ihm in der Entfernung von 23 cm (bis zur Mitte der Lampe gemessen) eine aufrecht stehende, mattierte, kugelförmige Metalldrahtlampe von 50 Kerzen. Zwischen Colo-

rimeter, 6 cm von diesem entfernt, und der Lampe sind drei dicht aneinander gelegte Mattscheiben, die den ganzen Querschnitt des Kastens ausfüllen, zur Zerstreuung des Lichtes angebracht. Die Lampe ist selbstverständlich möglichst genau in der Mitte der Längsrichtung des Kastens aufgestellt. Trotzdem ist es nötig, die Bestimmungen wechselseitig zu machen, d. h. die Zylinder nach geschehenen Bestimmungen zu vertauschen, neue Bestimmungen auszuführen und den Durchschnitt aller zu nehmen, denn eine vollständig gleichmäßige Beleuchtung beider Hälften des Gesichtsfeldes des Colorimeters wird selten erreicht. Der Kasten wird nach oben durch ein schwarzes Tuch vollständig abgedeckt.

Erforderliche Lösungen.

1. Eine $^n/_{100}$-Salzsäure,
2. eine $1^0/_0$ige Lösung reinsten Gummi arabicums,
3. eine wässerige Lösung von Bleinitrat, die im Liter 0,1599 g Bleinitrat enthält. 1 ccm dieser Lösung enthält somit 0,0001 g Pb,
4. gesättigte Schwefelwasserstofflösung.

Zum Mischen der Bleisalzlösung mit $^n/_{100}$-Salzsäure, Gummilösung und Schwefelwasserstofflösung benutzen wir Maßkölbchen, die im ganzen auf 120 ccm calibriert sind, am unteren Teile des Halses die Marke 100 haben, dann nach einer kugelförmigen Ausbuchtung des Halses die Marke 110 ccm, nach einer zweiten kugelförmigen Ausbuchtung die Marke 120 ccm. Die zu untersuchende wässerige Lösung wird in das Kölbchen übergeführt und mit Wasser auf das Volumen 100 gebracht, oder bei wässerigen Lösungen, deren Bleigehalt bestimmt werden soll, wie bei Leitungswässern, wird mit dieser Lösung, mit dem Leitungswasser, das Kölbchen bis zur Marke 100 gefüllt. Hierauf gibt man mit einer 9 ccm-Pipette oder einer Bürette genau 9 ccm $^n/_{100}$-Salzsäure und bis zur Marke 110 $1^0/_0$ige Gummilösnng (1 ccm). Darauf wird genau bis zur Marke 120 mit gesättigtem Schwefelwasserstoffwasser aufgefüllt. Hierauf schätzt man den Bleigehalt ungefähr, indem man die Braunfärbung der Mischung im Kölbchen beurteilt, was bei einiger Übung leicht ist. Nach der Schätzung stellt man die Vergleichslösung her, indem man in einem zweiten Maßkölbchen,

das dem ersten gleich ist, eine mit der Bürette von der ungefähren Schätzung abgemessene Menge Bleinitratlösung von 0,1599 g Bleinitrat im Liter gibt, mit Wasser auf 100 auffüllt, 9 ccm $^n/_{100}$-Salzsäure dazugibt, und mit 1°/₀iger Gummilösung auf 110, mit Schwefelwasserstoffwasser auf 120 ccm auffüllt. Beide Kölbchen werden nach dem Auffüllen wiederholt umgeschüttelt. Man gießt je eine der Lösungen in die Colorimetergefäße und führt folgendermaßen die Bestimmung aus: Auf der Seite, auf der sich die Vergleichslösung befindet, stellt man auf eine runde Zahl ein, etwa auf 80, und verstellt nun den Eintauchzylinder auf der anderen Seite, bis beide Hälften des Gesichtsfeldes gleich dunkel erscheinen. Diese Einstellung hat wie alle Einstellungen bei optischen Messungen schnell zu geschehen. Man macht hintereinander etwa 5 Einstellungen und Ablesungen, vertauscht die Gefäße (die Eintauchzylinder sind natürlich mit Fließpapier zu reinigen), stellt den Eintauchzylinder der Vergleichslösung auf dieselbe Zahl wie vorher (z. B. 80) und macht ebensoviel Ablesungen wie vor der Vertauschung. Aus allen Werten nimmt man den Durchschnitt. Da sich die Höhen der Flüssigkeitssäulen umgekehrt proportional wie die Bleikonzentrationen verhalten, berechnet sich der gesuchte Bleigehalt so: z. B. Vergleichslösung verwendet 0,3 mg Pb. Einstellung der Vergleichslösung links und rechts: 80.

Im Durchschnitt gefundener Skalenteil der zu untersuchenden Lösung: 65.

$$x : 0{,}3 = 80 : 65$$

$$x = \frac{80 \cdot 0{,}3}{65} = 0{,}369 \text{ mg.}$$

Also die gefundene Menge Blei ist 0,369 mg, oder das zu untersuchende Wasser enthält 0,369 mg in 100 ccm, also 3,69 mg im Liter.

Bei einiger Übung dauert eine solche ganze Bestimmung etwa 10 Minuten. Wir haben beobachtet, daß bei Tageslicht die Bestimmungen genauer ausfallen als bei künstlichem Licht. (Das Colorimeter wird, wie oben beschrieben, stets mit künstlichem Lichte, der elektrischen Metalldrahtlampe, beleuchtet.)

Es seien einige Beispiele der einzelnen Ablesungen aus unserem Protokoll ausgeführt.

1. Einstellung der Vergleichslösung: 90.
Zu untersuchende Lösung rechts im Colorimeter: 63, 62, 62, 62, 61,
" " " links " " : 71, 72, 71, 71, 72.

2. Einstellung der Vergleichslösung: 70.
Zu untersuchende Lösung rechts im Colorimeter: 88, 87, 89, 88, 88,
" " " links " " : 86, 85, 86, 87, 85.

Zur Beurteilung der Fehlergröße sind die Resultate von 28 Bestimmungen in den Tabellen I und II aufgeführt. Sowohl die Analysen der Tabelle I als auch die der Tabelle II sind so, wie sie angegeben sind, hintereinander ausgeführt worden, keine einzige ist weggelassen worden. Wir haben so gearbeitet, daß der eine von uns (S.) die Lösungen hergestellt hat, der andere (P.), ohne den Bleigehalt auch nur ungefähr zu kennen, die Bestimmungen ausgeführt hat. Es war dies notwendig, damit der Untersucher die Vergleichslösung ohne jede Voreingenommenheit schätzen konnte.

Tabelle I.

Lfde. Nr.	Gegebene Mengen der Kationen			Die angewandte Vergleichslösung enthielt Pb	Gefundene Mengen Pb	Differenz
	Pb mg	Fe mg	Mn mg	mg	mg	mg
1	0,34	0,2	—	0,2	0,336	— 0,004
2	0,23	0,1	0,1	0,2	0,23	0
3	0,08	—	—	0,05	0,07	— 0,01
4	0,39	0,1	0,1	0,2	0,372	— 0,018
5	Dieselbe Bestimmung			0,4	0,402	+ 0,012
6	0,26	—	—	0,3	0,235	— 0,025
7	0,14	0,1	0,1	0,1	0,153	+ 0,013
8	0,29	0,2	—	0,3	0,254	— 0,036
9	0,11	0,1	0,1	0,1	0,100	— 0,01
10	0,39	0,1	—	0,3	0,385	— 0,005
11	0,16	0,1	0,1	0,1	0,150	— 0,01
12	Dieselbe Bestimmung			0,2	0,166	+ 0,006
13	0,25	—	—	0,2	0,243	— 0,007
14	0,34	0,2	—	0,2	0,346	+ 0,006
15	0,22	0,1	—	0,2	0,229	+ 0,009
16	0,04	0,1	—	0,05	0,035	+ 0,005
17	0,06	0,1	0,1	0,1	0,064	+ 0,004

Das Eisen und Mangan wurde aus entsprechenden Lösungen von Ferrosulfat und Mangansulfat, die 0,1 g des betreffenden Kations im Liter enthielten, zugesetzt. Man sieht, daß die Gegenwart des Eisens und Mangans die Resultate der Analysen

in keiner Weise beeinflußt. Wenn man nur 0,04 mg Blei hat und findet 0,05, so ist der absolute Fehler 0,01 mg, der relative aber 25 %. Selbstverständlich sind solche Bestimmungen nur dann ausführbar, wenn es bei der Beurteilung des Wertes nicht darauf ankommt, ob 0,04 oder 0,05 mg vorhanden sind. Wir sind dabei, die Genauigkeit für sehr kleine Werte dadurch zu heben, daß wir unter Abänderung des Colorimeters die gegebene Bleimenge nicht zu 100 bzw. 120 ccm auffüllen, sondern etwa auf den 5. Teil, ohne die Schichtengröße im Colorimetergefäße zu verringern. Wir haben auch mit derselben Methode Bestimmungen mit viel größeren Mengen Blei ausgeführt und werden über diese später berichten.

Für die Bestimmung des Bleies im Leitungswasser kam es darauf an, zu prüfen, ob etwa die vorhandenen Calciumsalze das Bleisulfid auch bei Anwendung der angegebenen Menge der Lösung von Gummi arabicum ausflocken und dadurch die Bestimmung beeinflussen. Deshalb haben wir die zu den in Tabelle II aufgeführten Bestimmungen verwendeten Untersuchungsobjekte so hergestellt, daß wir die abgemessenen Bleimengen in abgelaufenem, völlig bleifreiem Leitungswasser gelöst haben. Das betreffende Wasser besaß zwar eine Carbonathärte von nur ungefähr 1, aber eine Gesamthärte von gegen 7.

Tabelle II.

Lfde. Nr.	100 ccm enthielten Pb mg	Die angewandte Vergleichslösung enthielt Pb mg	Gefundene Mengen Pb mg	Differenz mg
1	0,2	0,2	0,192	− 0,008
2	0,03	0,05	0,043	+ 0,013
3	0,07	0,05	0,073	+ 0,003
4	0,1	0,05	0,094	− 0,006
5	0,06	0,05	0,064	+ 0,004
6	0,24	0,2	0,248	+ 0,008
7	0,4	0,3	0,403	+ 0,003
8	0,13	0,1	0,132	0,002
9	0,08	0,05	0,07	0,01
10	0,19	0,2	0,165	0,025
11	0,04	0,05	0,05	0,01

Für die Beurteilung der Schädlichkeit von Trinkwasser legt man die Werte pro Liter zugrunde, indem man im allgemeinen als höchste zulässige Grenze den Gehalt von 0,35 mg pro Liter

annimmt. Da bei unserer Methode die Bestimmungen mit 100 ccm Wasser ausgeführt werden, müssen also hier die erhaltenen Werte mit 10 multipliziert werden.

Man erhielt pro Liter berechnet:

1. 1,92 mg anstatt 2 mg. 2. 0,43 mg anstatt 0,3 mg. 3. 0,73 mg anstatt 0,7 mg. 4. 0,94 mg anstatt 1 mg. 5. 0,64 mg anstatt 0,6 mg. 6. 2,48 mg anstatt 2,4 mg. 7. 4,03 mg anstatt 4 mg. 8. 1,32 mg anstatt 1,3 mg. 9. 0,7 mg anstatt 0,8 mg. 10. 1,65 mg anstatt 1,9 mg. 11. 0,5 mg anstatt 0,4 mg.

Glykolaldehyd als Assimilationszwischenprodukt[1]).

Von

Heinrich Fincke (Cöln).

(Eingegangen am 9. März 1914.)

Die Formaldehydhypothese Baeyers[2]) hat sich trotz zahlreicher Versuche, ihre Richtigkeit festzustellen, bisher nicht beweisen lassen. Die vereinzelt bis zu einem gewissen Grade geglückten Ernährungsversuche von Pflanzen mit Formaldehyd[3]) können als wirkliche Beweise nicht gelten, da eine indirekte Verwendung des zugeführten Formaldehyds zur Zuckerbildung nicht ausgeschlossen ist und im allgemeinen keine normale Entwicklung der Formaldehydpflanzen erzielt und die Mitwirkung des Lichtes nicht entbehrt werden konnte. Der Nachweis eines Formaldehydgehaltes der Pflanzen ist vermutlich nicht zu erbringen[4]). Die Bildung von Formaldehyd bei dem Abbau von Kohlenhydraten und anderen Pflanzenstoffen ist nicht ausgeschlossen[5]). Als schwerwiegenden Einwand gegen die Formaldehydhypothese muß man die Tatsache ansehen, die der Grund für die Giftigkeit des Formaldehyds ist, seine außerordentliche Reaktionsfähigkeit; diese bewirkt, daß Formaldehyd auch in starker Verdünnung mit Stoffen der Zelle Verbindungen eingehen kann, die für die Pflanze nachteilig sein müssen. Hierbei dem gasförmigen Formaldehyd andere Eigenschaften wie

[1]) Vgl. Fincke, Der Aufbau der Kohlenhydrate in den Pflanzen. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel. 27, 8, 1914.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **3**, 63, 1870.

[3]) Bokorny, diese Zeitschr. **36**, 83, 1911. — Grafe, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **29**, 19. Ref. Chem. Centralbl. **1911**, I, 1369; Derselbe, Einführung in die Biochemie, Leipzig u. Wien **1913**, 183, 184.

[4]) Fincke, diese Zeitschr. **52**, 214, 1913.

[5]) Rosenthaler, Arch. d. Pharmazie **251**, 587, 1913. — Czapek, Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl. **1**, 625, Jena 1913.

der Formaldehydlösung zuzuschreiben[1]), hat keinen Zweck, da der Formaldehyd erst nach vorhergegangener Lösung auf den Organismus einwirken kann. Die Unterschiede im Verhalten des gasförmigen und gelösten Formaldehyds dürften in der geringeren Konzentration zu suchen sein, in der der erstere angewandt wurde.

Untersucht man die Frage, welche anderen Stoffe außer Formaldehyd als in Pflanzen entstehende Zwischenprodukte der Zuckerbildung theoretisch in Frage kommen können, so ergibt sich eine große Wahrscheinlichkeit für den Glykolaldehyd.

Die Annahme der intermediären Entstehung des Glykolaldehyds steht zu bisherigen Assimilationshypothesen in mehrfacher Beziehung:

1. Die Formaldehydhypothese Baeyers muß den Glykolaldehyd als zweites Assimilationsprodukt annehmen, da erwiesen ist, daß er das erste Kondensationsprodukt des Formaldehyds ist[2]).

2. Nach der auf die alte Liebigsche Hypothese[3]) zurückgreifenden Ansicht Baurs[4]) ist Oxalsäure erstes Produkt der Kohlensäurereduktion bei der Assimilation, die dann zu Glykolsäure reduziert werden soll, woraus durch Zerfall Ameisensäure und Formaldehyd entstehen können. Ist die Annahme richtig, daß aus der Kohlensäure zunächst Oxalsäure und dann Glykolsäure entstehen, so ist die weitere Reduktion zum Glykolaldehyd wahrscheinlicher als die Bildung von Formaldehyd durch Spaltung, denn diese Entstehungsweise wäre ein unnötiger Umweg. Im übrigen würde auch in diesem unwahrscheinlichen Falle der Formaldehydbildung die Kondensation zu Glykolaldehyd folgen müssen.

3. Nach Brunner[5]), Koenigs[6]) und Traube[7]) ist Glyoxylsäure ein wichtiges Assimilationszwischenprodukt, das durch

[1]) Grafe, Einführung in die Biochemie, Leipzig u. Wien 1913, 183.
[2]) Euler, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 39, 1906. — Přibram und Franke, Monatsh. f. Chem. 32, 415, 1911.
[3]) Liebigs Annal. 46, 58, 1843.
[4]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 63, 683, 1908; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 46, 852, 1913.
[5]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 12, 541, 1879; 19, 595, 1886.
[6]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 25, 800, 1892.
[7]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 40, 4946, 1908.

Reduktion von Oxalsäure entstehen soll. Die zweitnächste Reduktionsstufe der Glyoxylsäure ist der Glykolaldehyd.

Für eine Mitwirkung von Glykolaldehyd bei Synthesen im Pflanzenkörper lassen sich folgende Tatsachen anführen:

1. Seine leichte Kondensierbarkeit zu Kohlenhydraten außerhalb des Organismus[1].

2. Seine leichte Kondensierbarkeit zu Kohlenhydraten im tierischen Organismus[2].

3. Die einfache Erklärung für die bei Dickblattgewächsen und in reifenden Früchten stattfindende Bildung von Kohlenhydraten aus organischen Säuren durch die Annahme eines Reaktionsverlaufes, der der Bildung von Glykolaldehyd durch Oxydation von Weinsäure nach Fenton[3] (I) oder durch enzymatische Spaltung von Oxybrenztraubensäure nach Neuberg und Kerb[4] (II) ähnlich verläuft[5].

I.

$$\begin{matrix} CHOH.COOH \\ | \\ CHOH.COOH \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} COH.COOH \\ \| \\ COH.COOH \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} CHOH \\ \| \\ CHOH \end{matrix} \quad (+ 2 CO_2) \rightarrow \begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CHO \end{matrix},$$

II.

$$\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CO.COOH \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CHO \end{matrix} \quad (+ CO_2).$$

4. Das häufige Vorkommen von Verbindungen der Zweikohlenstoffreihe in den Pflanzen (Äthylalkohol, Acetaldehyd, Essigsäure, Aminoäthylalkohol, Cholin, Glykolsäure, Glykokoll, Betain, Glyoxylsäure, Allantoin, Oxalsäure), die zwar zum Teil Abbauprodukte sind (Äthylalkohol, Oxalsäure), zum

---

[1]) Biochem. Handlexik. 2, 266.

[2]) Mayer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 133, 1903. — Parnas u. Baer, diese Zeitschr. 41, 392, 1912. — Barrenscheen, diese Zeitschr. 58, 300, 1914.

[3]) Journ. chem. Soc. 1895, I, 774; Biochem. Handlexik. 2, 265.

[4]) Diese Zeitschr. 58, 416, 1913.

[5]) Nach Czapek, Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl. 1, 626, 1913, soll Jackson bei Pflanzen Stärkebildung aus Glykolaldehyd nachgewiesen haben.

Teil aber vermutlich beim Aufbau entstehen (Aminoäthylalkohol, Cholin, Glykokoll). Die einfache Ableitbarkeit der Mutterstoffe von Cholin und Glykokoll und Betain, des Glykols und der Glykolsäure, von dem Glykolaldehyd nach der Cannizzaroschen Reaktion[1]):

$$2\begin{array}{l}CH_2OH\\|\\CHO\end{array} \rightarrow \begin{array}{l}CH_2OH\\|\\CH_2OH\end{array} + \begin{array}{l}CH_2OH\\|\\COOH.\end{array}$$

5. Das Überwiegen der Verbindungen mit gerader Kohlenstoffatomzahl in den Pflanzen, das besonders hervortritt, wenn man berücksichtigt, daß die meisten Verbindungen der Dreikohlenstoffreihe (z. B. Milchsäure, Glycerin) und der Fünfkohlenstoffreihe (z. B. die Pentosen) aus Hexosen entstehen.

6. Die einfache Ableitbarkeit zahlreicher anderer Verbindungen der Pflanzen vom Glykolaldehyd, wobei allerdings zunächst dahingestellt bleiben muß, ob diese Verbindungen nicht ganz oder teilweise auf anderen Wegen entstehen. Zu nennen ist z. B. die Möglichkeit der Bildung von Serin aus Glykolaldehyd, Blausäure und Ammoniak, von Äpfelsäure aus je einem Molekül Glykolaldehyd und Glyoxylsäure, von Trikarballylsäure (bzw. Citronensäure und Aconitsäure) aus Glykolaldehyd und Äpfelsäure (bzw. Weinsäure).

Außer den angegebenen Möglichkeiten für die Bildung von Glykolaldehyd in den Pflanzen durch Kondensation von Formaldehyd oder Reduktion von Oxalsäure unter Zugrundelegung der bisherigen Assimilationshypothesen ist die Möglichkeit seiner Bildung aus zwei Molekülen Kohlensäure unter Mitwirkung eines anderen Atomkomplexes ins Auge zu fassen. Als solcher wäre zum Beispiel eine superoxydartige Verbindung eines Chlorophyllbestandteiles denkbar, da zur Assimilation die Gegenwart von Sauerstoff erforderlich ist, Superoxyde reduzierend wirken können, so eine Erklärung für die schnelle Entbindung der gleichen Raummenge Sauerstoff bei der Kohlensäureaufnahme im Licht gegeben und nach den Untersuchungen von Willstätter und Utzinger[2]) neben der

---

[1]) Trier, Zeitschr. f. physiol. Chem. 78, 388, 1911.

[2]) Liebigs Annal. 382, 129, 1911.

physikalischen auch eine chemische Funktion des Chlorophylls bei der Assimilation wahrscheinlich ist. Die Annahme der Mitwirkung eines anderen Stoffes, an den sich die zu reduzierende Kohlensäure zunächst anlagert, ist wiederholt aufgestellt worden, doch nicht in Verbindung mit der Entstehung von Glykolaldehyd. Dieser Gedanke läßt sich in folgender Weise veranschaulichen:

$$R + O_2 \rightarrow R\left<\begin{matrix} O \\ | \\ O \end{matrix}\right.$$

$$R\left<\begin{matrix} O \\ | \\ O \end{matrix}\right. + \begin{matrix} O{=}C\left<\begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix}\right. \\ O{=}C\left<\begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix}\right. \end{matrix} \rightarrow \underset{\text{I}}{R\left<\begin{matrix} C\left<\begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix}\right. \\ | \\ C\left<\begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix}\right. \end{matrix}\right.} + \begin{matrix} O_2 \\ \\ O_2 \end{matrix}$$

$$R\left<\begin{matrix} C\left<\begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix}\right. \\ | \\ C\left<\begin{matrix} OH \\ OH \end{matrix}\right. \end{matrix}\right. \rightarrow \underset{\text{II}}{R\left<\begin{matrix} O{-}C\left<\begin{matrix} H \\ OH \end{matrix}\right. \\ | \\ O{-}C\left<\begin{matrix} H \\ OH \end{matrix}\right. \end{matrix}\right.} \rightarrow R\left<\begin{matrix} O \\ | \\ O \end{matrix}\right. + \underset{\text{III}}{\begin{matrix} C\left<\begin{matrix} H \\ OH \end{matrix}\right. \\ \| \\ C\left<\begin{matrix} H \\ OH \end{matrix}\right. \end{matrix}}$$

$$\begin{matrix} C\left<\begin{matrix} H \\ OH \end{matrix}\right. \\ \| \\ C\left<\begin{matrix} H \\ OH \end{matrix}\right. \end{matrix} \rightarrow \underset{\text{IV}}{\begin{matrix} CHO \\ | \\ CH_2OH \end{matrix}}$$

In der ersten Phase der Reaktion treten unter dem Einflusse der Lichtenergie die beiden Sauerstoffatome des Superoxydes zusammen mit den beiden Carbonylsauerstoffatomen zweier Kohlensäurehydratmoleküle aus: das gleiche Volumen Sauerstoff wird sofort frei. In der zweiten Phase erfolgt Sauerstoffverschiebung innerhalb der Verbindung I und Spaltung der Verbindung II unter Freiwerden des dem Glykolaldehyd isomeren ungesättigten zweiwertigen Alkohols (III), der auch bei der Darstellung von Glykolaldehyd aus Weinsäure bzw. Dioxymaleinsäure intermediär entsteht. In der dritten Phase der Reaktion entsteht durch Umlagerung des Isomeren der beständigere Glykolaldehyd (IV).

Durch Spaltung des Zwischenproduktes I kann man sich Glyoxylsäure (V) entstehend denken:

```
     ╱C(OH)(OH)                C(OH)(OH)
R<    |          → R +         ‖
     ╲C(OH)(OH)                C(OH)(OH)
  I

C(OH)(OH)        C(=O)(OH)
‖           →    |
C(OH)(OH)        CH(OH)(OH)
                  V
```

In dem Zwischenprodukt II sind die beiden Kohlenstoffatome asymmetrisch; unter der Einwirkung des als optisch aktiv anzunehmenden Komplexes R kann daher eine optisch aktive Form entstehen. Bei der Spaltung des Zwischenproduktes II geht die Asymmetrie jedoch verloren. Durch Anlagerung weiterer asymmetrischer Kohlenstoffatome an die Kohlenstoffatome der Verbindung II vor Eintritt der Spaltung können aber auch diese optische Aktivität erlangen, so daß bei späterer Spaltung sämtliche asymmetrischen Kohlenstoffatome der entstandenen Kohlenstoffkette aktiv sind. Auf Grund dieser Überlegung läßt sich folgendes Modell für die Entstehung der d-Glucose aufstellen:

```
   ╱O—C(H)(OH)          ╱O—C(H)(OH)          ╱O     C(H)(OH)          CHO
R<     |             R<     |             R<  |  +  ‖                  |
   ╲O—C(H)(OH)          ╲O—C—OH              ╲O     C—OH            H—C—OH
                            |                        |                 |
CHO                     OH—C—H               OH—C—H              OH—C—H
 |        →                 |         →           |         →         |
CH2OH                    H—C—OH               H—C—OH              H—C—OH
CHO                         |                     |                   |
 |                       H—C—OH               H—C—OH              H—C—OH
CH2OH                       |                     |                   |
                          CH2OH                CH2OH               CH2OH
```

Somit wäre die Entstehung der d-Glucose durch Kondensation von zwei Molekülen Glykolaldehyd mit dem Zwischenprodukt II einfach erklärbar. Von dem nach dem angegebenen Reaktionsschema als Vorstufe der d-Glucose auftretenden ungesättigten Alkohol $CH_2(OH).[CH(OH)]_3.C(OH) = CH(OH)$ leiten sich außer d-Glucose auch die in den Pflanzen verbreiteten Zucker d-Fructose und d-Mannose ab[1]), so daß auch diese daraus entstehen könnten.

Bildung von Inosit läßt sich in folgender Weise darstellen:

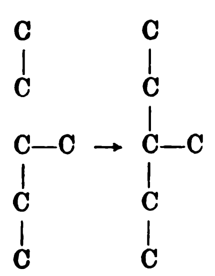
```
          CH2OH                          H  OH
          |                               \/
          CHO                             C
                                        /   \
          /H                           /     \
     /O—C<                       /O—C—OH      CH2OH
   R<    | \OH           →     R<    |
     \   | /H                    \O—C—OH      CH2OH      →
      O—C<                           \       /
          \OH                         \     /
                                        C
          CHO                          / \
          |                           H   OH
          CH2OH


              H  OH                         H  OH
               \/                            \/
     OH        C                              C
       \      / \                       H\  /   \  /H
   /O   C    /   CH2OH                   C        C
 R< |+ ||                          →  OH/ |        | \OH
   \O   C        CH2OH                H\ |        | /H
       /  \     /                        C        C
     OH    \   /                      OH/  \    /  \OH
            C                                 C
           / \                               / \
          H   OH                            H   OH
```

In ähnlicher Weise läßt sich ein Bild von der Entstehung von Trikarballylsäure, Citronensäure und Aconitsäure aus Glykolaldehyd und Äpfelsäure bzw. Weinsäure entwerfen, wobei die Kohlenstoffkette derselben in folgender Weise zustande kommt:

---

[1]) Wohl und Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 33, 3095, 1900.



Die angegebenen Bildungsweisen, so hypothetisch sie sind, veranschaulichen die Bildung der Kohlenhydrate und anderer Pflanzenstoffe in einfacher Weise. Die Beziehungen des Glykolaldehyds zu wichtigen Pflanzenstoffen zeigen, daß dem Glykolaldehyd, mag er erstes Assimilationsprodukt sein oder nicht, vermutlich eine sehr wichtige Aufgabe beim Aufbau der organischen Stoffe der Pflanze zukommt.

Glykolaldehyd ist bisher in Pflanzen nicht nachgewiesen worden; in dieser Beziehung steht er nicht ungünstiger als der Formaldehyd, zumal nach dem Glykolaldehyd nicht mit gleichem Eifer gesucht worden ist und die Nachweisverfahren des Glykolaldehyds an diejenigen des Formaldehyds hinsichtlich Empfindlichkeit und Sicherheit bei weitem nicht heranreichen.

Es empfiehlt sich, zur Aufklärung des Assimilationsvorganges das Entstehen und Verhalten des Glykolaldehyds in den Pflanzen mehr als bisher in den Bereich der Untersuchungen zu ziehen.

Über den Einfluß des Blutserums des Normalen und des Alkaptonurikers auf Homogentisinsäure.

Von

Oscar Groß.

(Aus der Medizinischen Klinik der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 10. März 1914.)

Die von dem Alkaptonuriker ausgeschiedene Homogentisinsäure wird im allgemeinen als ein normales intermediäres Stoffwechselprodukt angesehen, das von dem Alkaptonuriker nicht tiefer abgebaut werden kann, ähnlich wie dies beim Diabetes mellitus mit dem Traubenzucker der Fall ist. Wie es hierdurch zu einer Hyperglykämie und zur Zuckerausscheidung im Harn kommt, ebenso läßt sich im Blutserum des Alkaptonurikers Homogentisinsäure, die dann auch im Harn zur Ausscheidung kommt, nachweisen und verleiht diesem seine charakteristischen Eigenschaften.

Wenn wir es bei der Homogentisinsäure wirklich mit einem normalen intermediären Produkt des Stoffwechsels zu tun haben, so fragt es sich, welches Organ es ist, das für den weiteren Abbau zu sorgen hat. Durchspülungsversuche mit Homogentisinsäure an der überlebenden Leber von Embden, Salomon und Schmidt[1]) haben gezeigt, daß dabei die Homogentisinsäure verschwindet und als Endprodukt Acetonkörper entstehen. Damit ist natürlich noch nicht bewiesen, daß nur die Leber für den Abbau der Homogentisinsäure in Betracht kommt. Meine hierauf gerichteten Untersuchungen haben sich zunächst auf die Untersuchung des Blutes resp. des Blutserums gerichtet. Die Frage, die ich mir stellte, war die, ob darin ein Ferment nachweisbar wäre, das die Eigenschaft hat, die Homo-

---

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 152, 1906.

gentisinsäure abzubauen resp. zum Verschwinden zu bringen. Wenn dies im normalen Blut der Fall ist, so wäre es die nächste Aufgabe, nachzuforschen, ob beim Alkaptonuriker ein derartiges Ferment fehlt oder vielleicht vermindert ist. Die Homogentisinsäure, die ich zu meinen Untersuchungen verwandte, stammt von dem von Allard und mir[1]) seinerzeit beobachteten Falle von Arthritis alcaptonurica und war aus dem Harn mit den charakteristischen Eigenschaften als chemisch reine Substanz hergestellt. Der Schmelzpunkt beträgt 147°.

Zur Technik meiner Versuchsanordnung möchte ich bemerken, daß ich sowohl menschliches als auch tierisches Serum in den Bereich meiner Untersuchungen zog. Das nicht blutig tingierte Serum wurde nach dem Absitzen mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt, in der die Homogentisinsäure zuvor aufgelöst war. Die Flüssigkeit wurde in einem enghalsigen Meßkölbchen zum sicheren Luftabschluß mit Paraffinum liquidum überschichtet und nach Umschütteln im Brutschrank stehen gelassen. Es wurde möglichst steril gearbeitet und eventuell zur Vermeidung von Bakterienwirkung etwas Chloroform zugesetzt.

Zur Bestimmung der Homogentisinsäure wurde die Flüssigkeit mit Wasser — gewöhnlich auf das 10fache — verdünnt, in einer Porzellanschale unter stetem Umrühren bis zum Sieden erhitzt und das Eiweiß durch Zusatz von einigen Tropfen konzentrierter $ZnSO_4$-Lösung ausgefällt. In dem Filtrat wurde die Homogentisinsäure nach der üblichen Methode von Baumann bestimmt. Man bekommt so bei einiger Übung sehr genaue Resultate, wie folgender Auszug aus dem Protokoll zeigt:

Versuch 1.

10 ccm Kaninchenserum werden mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt, in der **0,049** g Homogentisinsäure gelöst sind. Es wird sofort die Bestimmung der Homogentisinsäure vorgenommen. Verdünnt auf 200 ccm, ausgefällt; 10 ccm des Filtrats zur Bestimmung der Homogentisinsäure.

Verbraucht 0,6 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

$4{,}124 \cdot 0{,}6 \cdot 20 = \mathbf{49{,}4}$ mg Homogentisinsäure.

Daraus geht hervor, daß man bei einiger Übung ganz genaue Werte erhält und die Methode auch für die Homogentisinsäurebestimmung im Serum sehr wohl geeignet ist.

---

[1]) Mitteil. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir. **19**, 1908; Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **59**, 1908; Zeitschr. f. klin. Med. **64**, H. 3/4.

Die weiteren Untersuchungen zeigten mir nun, daß bei längerem Stehen im Brutschrank die Homogentisinsäure in der Tat aus dem Blutserum verschwindet und daß die Menge der nicht mehr nachweisbaren Homogentisinsäure ungefähr proportional der Zeit der Einwirkung ist, allerdings nur in den ersten Stunden des Versuchs. Setzt man zuviel Homogentisinsäure zu oder steht das Serum zu lange im Brutschrank, so hört die Wirksamkeit allmählich auf.

Die Wirksamkeit ist in verschiedenen Serien ziemlich erheblichen Differenzen unterworfen.

Versuch 2.

10 ccm menschliches Blutserum, 12 Stunden alt, im Eisschrank abgesetzt, werden mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt, in der 0,131 g Homogentisinsäure aufgelöst sind. Nach 5 Stunden lassen sich in dem Serum nur noch 0,084 g Homogentisinsäure nachweisen.

Versuch 3.

25 ccm Hundeserum mit 25 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt, in der 0,193 g Homogentisinsäure gelöst sind. Nach 10 Stunden sind im Serum nur noch 0,098 g Homogentisinsäure vorhanden.

Versuch 4.

3 Portionen von je 10 ccm menschlichem Serum werden mit je 0,158 g Homogentisinsäure in je 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt.

Kölbchen Nr. 1 enthält nach 5 Stunden noch 0,120 g H,
„ „ 2 „ „ 10 „ „ 0,088 g H,
„ „ 3 „ „ 25 „ „ 0,046 g H.

Es wurden also verbraucht in

5 Stunden 38 mg Homogentisinsäure,
10 „ 70 „ „
25 „ 112 „ „

Wir sehen also in den ersten 10 Stunden des Versuchs eine ungefähre Proportionalität, dann aber ein starkes Absinken der fermentativen Kraft des Serums. Wiederholte Versuche ergaben ein ganz ähnliches Resultat. Ein vollkommenes Verschwinden der Homogentisinsäure aus dem Blutserum konnte nur bei Zusatz geringerer Mengen beobachtet werden.

Wir müssen annehmen, daß einerseits bei längerem Stehen im Brutschrank die fermentative Kraft abnimmt. Das konnte ich auch nachweisen, indem ich dasselbe Serum einmal frisch, einmal erst nach 24stündigem Stehen im Brutschrank untersuchte. In letzterem Falle war nachher nur ganz wenig Homogentisinsäure verschwunden. Außerdem scheinen hier ähnliche Dinge wie bei der peptischen Verdauung des Eiweißes eine

Rolle zu spielen, indem nämlich die Produkte der fermentativen Tätigkeit hemmend auf den fermentativen Prozeß selbst wirken.

Das im Serum vorhandene Ferment hat nun ferner die Eigenschaft, bei längerem Erhitzen auf 56 bis 60° abgeschwächt resp. vollkommen unwirksam zu werden. Dies zeigt

Versuch 5.

Serum eines Nephritikers, durch Aderlaß gewonnen.

2 Portionen von je 25 ccm.

Zu der einen werden 0,230 g Homogentisinsäure in 25 ccm physiol. NaCl-Lösung direkt zugesetzt, das Serum der anderen Portion vor Zusatz der Homogentisinsäure 1 Stunde im Wasserbade auf 56° erhitzt.

Untersuchung nach 13 Stunden.

In Probe I sind noch 0,040 g H, verschwunden also **0,190** g.
„ „ II „ „ 0,130 g H, „ „ **0,100** g.

Versuch 6.

Menschliches Blutserum, vor 24 Stunden durch Aderlaß entnommen und im Eisschrank abgesetzt.

Zu 5 ccm werden 0,167 g H in 5 ccm physiol. NaCl-Lösung zugesetzt. Zu einer zweiten Portion dieselbe Menge, jedoch wurde das Serum zuvor 2 Stunden lang auf 60° erhitzt.

Nach 16stündigem Stehen im Brutschrank Bestimmung der noch vorhandenen Homogentisinsäure.

In Probe I sind noch 0,062 g H, verschwunden also 0,105 g.
„ „ II „ „ 0,160 g H, „ „ fast gar nichts.

In Portion II ist noch die ganze Homogentisinsäure, die Differenz von 7 mg liegt innerhalb der Fehlergrenzen.

Versuch 7.

Versuchsanordnung wie in Versuch 6. Kaninchenserum. Zu jeder Portion von 25 ccm Serum 0,123 g H.

Untersuchung nach 2 mal 24stündigem Stehen im Brutschrank.

In Probe I sind noch 0,021 g H, verschwunden also 0,102 g.
„ „ II „ „ 0,113 g H, „ „ 0,010 g,
also findet sich in Portion II die ganze zugesetzte Homogentisinsäure wieder.

Ich habe eine größere Reihe verschiedener Sera untersucht. Es zeigte sich, daß in verschiedenen Seris die Widerstandsfähigkeit des Ferments gegen Erwärmung Schwankungen unterliegt, die keinerlei Konstanz haben und sich sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen Tieren zeigen.

Was nun die weiteren Eigenschaften des fermentativen Prozesses betrifft, so kann es sich nicht um einen oxydativen

Prozeß handeln, da die Flüssigkeit ihre helle Farbe behält und nicht die bei der Oxydation der Homogentisinsäure entstehenden schwarzen Produkte enthält. Welche Substanzen sind es nun, die aus der Homogentisinsäure entstehen? Auch hierbei bin ich zu einem Resultat gekommen, über das ich zunächst mit Vorbehalt Mitteilung machen möchte. Das Serum, direkt untersucht, ergibt eine stark positive Liebensche Jodoformprobe, während die Legalsche Probe mit Nitroprussidnatrium wegen des hohen Eiweißgehalts nicht angestellt werden kann. In dem Destillat des Serums ist auch die letztere Probe, wenn auch wegen der geringen Konzentration nur schwach, aber doch deutlich, positiv. Es dürfte daher wohl keinem Zweifel unterliegen, daß auch hier, wie bei den Untersuchungen von Salomon, Embden und Schmidt, aus der Homogentisinsäure Aceton geworden ist. Meine Untersuchungen waren bis hierher gediehen, als ich durch die große Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. Fromherz in Freiburg in den Besitz von Serum zweier Alkaptonuriker gelangte. Das Blut wurde am 13. II. abends steril entnommen, wurde im Eisschrank absetzen lassen und am 15. mit sterilen Pipetten in die ebenfalls vorher sterilisierten Glasgefäße eingefüllt und diese sofort zugeschmolzen. Gleichzeitig entnahm Herr Dr. Fromherz auf meinen Wunsch zur Kontrolle das Blut eines normalen Menschen, dessen Serum ebenso behandelt wurde. Die drei Sera wurden sofort mit Eilpost nach Greifswald geschickt und gelangten am 17. II. abends in meinen Besitz. Über die Alkaptonurikersera wurde mir mitgeteilt, daß Patient 1 (Scherer) Homogentisinsäure völlig quantitativ unverbrannt ausscheidet, daß bei Fall 2 (Hug) die Ausscheidung nicht immer ganz konstant ist. Die genauen Daten hierüber wird Herr Dr. Fromherz, wie er mir mitteilte, in seiner demnächst erscheinenden Arbeit veröffentlichen und sind für uns zunächst ohne Interesse. In folgendem sei das Ergebnis meiner Versuche mitgeteilt.

Versuch 8.

Patient 1 (Scherer). 10 ccm Serum werden mit 15 ccm physiol. Kochsalzlösung versetzt, in der 0,161 g Homogentisinsäure aufgelöst sind, das Ganze auf 50 ccm aufgefüllt und 24 Stunden im Brutschrank stehen gelassen, dann auf 200 ccm verdünnt, das Eiweiß ausgefällt; 5 ccm des Filtrates werden zur Homogentisinsäurebestimmung benutzt. Verbraucht werden 1,0 ccm $^{n}/_{10}$-Silberlösung. Im gesamten Kolbeninhalt sind also

vorhanden: 4,124·1,0·40 = **164,96** mg Homogentisinsäure. Es wurde also die ganze Homogentisinsäure wiedergefunden.

Versuch 9.

Serum 2 (Hug). Der Versuch wurde zugleich mit Versuch 8 unter genau denselben Bedingungen mit genau derselben Homogentisinsäurelösung ausgeführt und ergab genau dasselbe Resultat. Also auch hier keine Spur von Verschwinden der Homogentisinsäure.

Versuch 10.

Kontrollserum aus Freiburg. Ebenfalls dieselbe Versuchsanordnung. Gefunden wurden nach 24 Stunden nur 53 mg Homogentisinsäure, es sind also verschwunden 108 mg Homogentisinsäure.

Versuch 11 bis 14.

Eine Wiederholung des Versuchs mit Zusatz von 211 mg Homogentisinsäure ergab für die Alkaptonurikersera dasselbe Resultat wie in Versuch 8 und 9. In dem Kontrollserum fanden sich noch 67 mg, verschwunden also 144 mg Homogentisinsäure.

Fasse ich also das Resultat meiner Untersuchungen zusammen, so geht daraus hervor, daß 1. normales Tier- und Menschenserum Homogentisinsäure zum Verschwinden bringt; 2. daß aus dieser Homogentisinsäure mit Wahrscheinlichkeit Aceton gebildet wird; 3. daß in dem Alkaptonurikerserum das Homogentisinsäure abbauende Ferment fehlt, so daß es diese nicht zum Verschwinden bringt.

Über zuckerfreie Hefegärungen. XIV[1]).

Fortgesetzte Untersuchungen über die Carboxylase.

Von

C. Neuberg und P. Rosenthal.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule, Berlin.)

In früheren Mitteilungen[2]) ist eine Reihe wesentlicher Unterschiede in der Wirkungsart von Carboxylase und Zymase bekannt gegeben worden.

Um weitere Anhaltspunkte für die Stellung der Carboxylase im Komplex der zuckerzerlegenden Fermente zu gewinnen, haben wir einige neue Versuche über die Carboxylase vorgenommen und berichten darüber im folgenden.

Unterschiede im Verhalten der Carboxylase und Zymase zu Fruchtzucker bei Gegenwart von Chloroform.

Es ist denkbar und insbesondere für die Gärung angenommen worden, daß der Traubenzucker vor seinem Abbau durch physiologische Agenzien zunächst in Fruchtzucker übergeführt werde, ähnlich wie das im Reagensglase durch Einwirkung verdünnter Alkalien möglich ist. Daraus erwuchs die Notwendigkeit, festzustellen, ob zwischen der Wirkung der Carboxylase und der Vergärung des Fruchtzuckers ebensolche Differenzen wie zwischen der Vergärung der Brenztraubensäure und der Glucose bestehen. Die Versuche (Tabelle α und β) entsprechen den

---

[1]) Nach einem Vortrag in der Deutsch. chem. Ges. in der Sitzung vom 23. VI. 1913; Auszug aus der Dissertation von P. Rosenthal, eingereicht in Berlin, Dezember 1913.

[2]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. 36, 76, 1911. — C. Neuberg und P. Rosenthal, diese Zeitschr. 51, 128, 1912.

früher[1]) in den Tabellen a und h angeführten Experimenten, nur daß an Stelle von Traubenzucker eine 1,6%ige Fructoselösung verwendet wurde.

Chloroformversuche mit d-Fructose und lebenden Hefen.

α.

Heferasse	CO_2 aus 1,6%iger Fructoselösung nach		CO_2 aus 1,6%iger Lösung von brenztraubens. Kalium nach		CO_2 aus Hefe allein mit Chloroformwasser nach	
	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm
XII	0	3	3	5	0	0
K	0	3	1	3	0	Spur

Chloroformversuch mit Fructose und Trockenhefen[2]).

β.

Heferasse	CO_2 aus 1,6%iger Fructoselösung nach		CO_2 aus 1,6%iger Lösung von brenztraubens. Kalium nach		CO_2 aus Hefe allein mit Chloroformwasser nach	
	5 Std. ccm	12 Std. ccm	5 Std. ccm	12 Std. ccm	5 Std. ccm	14 Std. ccm
Trockenhefe M	0	0	0	5	0	0
Trockenhefe XII	0	0	0	2	0	0
Münch. Trockenhefe	0	Spur	0	5	0	1,5

Auch hier ergibt sich, daß Brenztraubensäure unter Bedingungen vergoren wird, wo Fruchtzucker nicht gespalten wird.

Über Beständigkeit der Carboxylase beim Aufbewahren von Macerationssäften.

Die Carboxylase darf im Vergleich zur Zymase nach unseren früheren Befunden als ein recht beständiges Ferment gelten. Es sind nunmehr einige weitere Versuche über die Beständigkeit der Carboxylase in Macerationssäften angestellt worden.

[1]) Diese Zeitschr. 51, 128. Hinsichtlich der Versuchanordnung verweisen wir auf unsere Ausführungen an dieser Stelle.

[2]) Getrockneten, aber nicht abgetöteten Hefen.

Diese sind in der Weise vorgenommen, daß die Säfte unter Zusatz verschiedener Antiseptica teils bei Zimmertemperatur (18 bis 22⁰), teils im Eisschrank bei 4 bis 8⁰, teils im Frigo bei — 1 bis — 2⁰ aufbewahrt wurden.

Die Wirkung des Macerationssaftes auf Traubenzucker kann nach den früheren Darlegungen nach 3 bis 4 Tagen als erloschen betrachtet werden. Die Tabellen *γ*, *δ* und *ε* tun dar, daß die Carboxylase sich bis zu 14 Tagen unter günstigen Bedingungen halten kann.

Macerationssaft unter Zugabe von 0,5 % Allylsenföl bei Zimmertemperatur und im Eisschrank aufbewahrt.

γ.

Auf-bewahrungs-dauer	Bei 18 bis 22⁰ (Zimmer-temperatur). CO_2 aus einer Mischung von 12 ccm Saft und 2 Tropfen 99 % iger Brenztraubensäure nach		Bei + 6⁰ im Eisschrank. CO_2 aus einer Mischung von 12 ccm Saft und 2 Tropfen 99 % iger Brenztraubensäure nach	
	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.
Tage	ccm	ccm	ccm	ccm
3	4	6	6	6
4	3,5	8	6	6
5	0	0	2	4
6	0	0	2	4
9	0	0	2	4
10	0	0	0	0

Macerationssaft mit und ohne Allylsenföl bei Zimmertemperatur und bei — 1⁰ bis — 2⁰ im Frigo aufbewahrt.

δ.

Auf-bewahrungs-dauer	Bei 18 bis 22⁰ (Zimmer-temperatur). CO_2 aus einer Mischung von 12 ccm Saft (ohne Antisepticum) und 2 Tropfen 90 % iger Brenztraubensäure nach		Bei + 4 bis 8⁰ im Eisschrank. CO_2 aus einer Mischung von 12 ccm Saft (mit Allylsenföl) und 2 Tropfen 99 % iger Brenztraubensäure nach	
	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.
Tage	ccm	ccm	ccm	ccm
8	5	6	4	5
9	4,5	5,5	4	6
10	2	4	3	5
11	2	3	3	4
14	0	0	2	3
16	0	0	0	0

Macerationssaft mit und ohne Toluol bei Zimmertemperatur und im Eisschrank (+4° bis +8°) aufbewahrt.

e.

Aufbewahrungsdauer	Bei 18 bis 22° (Zimmertemperatur). CO_2 aus einer Mischung von 12 ccm Saft (mit Toluol) und 2 Tropfen 99%iger Brenztraubensäure nach		Bei +6° im Eisschrank. CO_2 aus einer Mischung von 12 ccm Saft allein und 2 Tropfen 99%iger Brenztraubensäure nach	
	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.
Tage	ccm	ccm	ccm	ccm
4	4	6	3	5
5	3,5	6	2	4
6	3	5	2	3
7	2	4	Spur	Spur
8	1/2	2	0	0
9	0	0	0	0

Daß auch ohne absichtlich herbeigeführte Eingriffe längere Zeit aufbewahrte Trockenhefen an Zymase verarmen können, ohne die Carboxylasewirkung einzubüßen, ist jüngst[1]) gezeigt worden.

Verhalten von Carboxylase und Zymase in Fällungen aus Macerationssaft.

Buchner[2]) hat gezeigt, daß sich aus Hefepreßsaft ein Niederschlag durch Fällung mit Alkohol und Äther oder durch Aceton erzeugen läßt, der die Zymase einschließt und auch nach dem Trocknen und Wiederauflösen im Wasser Zucker zur Vergärung bringt. Wenn nun die Carboxylase wirklich ein Glied im System der zuckervergärenden Enzyme bildet, so muß es möglich sein, auch die Carboxylase aus dem Macerationssaft in Form eines Dauerpräparates darzustellen. Dies gelingt leicht auf folgende Weise:

50 ccm Saft werden in ein Gemisch von 400 ccm absol. Alkohol und 200 ccm Äther unter Turbinieren rasch eingetragen, der Niederschlag sofort abgesaugt, mit absolutem Alkohol und absolutem Äther ausgewaschen und 24 Stunden lang im Vakuumexsiccator getrocknet.

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 56, 497, 1913.
[2]) Buchner, Zymasegärung, S. 230.

Statt der Alkoholäthermischung ist es auch angängig, 500 ccm Aceton zu verwenden und hernach mit wasserfreiem Aceton auszuwaschen.

So erhält man ein staubendes weißes Pulver in einer Menge von 6 bis 8 g, wechselnd mit der Qualität der angewandten Trockenhefe. Der hauptsächlich aus Eiweiß bestehende Niederschlag löst sich in 40 ccm Wasser mit gelber Farbe beim Stehen — rascher beim Verrühren — auf und vergärt Rohrzucker sowie Brenztraubensäure stürmisch.

In manchen Fällen hatte man den Eindruck, daß die wässerige Lösung der zuvor in fester Form ausgefällten Fermente schneller als der native Saft die Gärung errege.

Es ist ferner gelungen, auch an dieser Art von Ferment-Dauerpräparaten den Nachweis für die große Beständigkeit der Carboxylase im Vergleich zur Zymase zu erbringen.

Hierzu wurde zunächst, wie von uns früher beschrieben worden ist, eine größere Menge frischen Macerationssaftes durch Erhitzen auf 50 bis 51° inaktiviert und dann von ausgeschiedenem Eiweiß abfiltriert. 50 ccm des Filtrates wurden nun ganz analog dem oben angeführten Verfahren durch Eingießen in turbiniertes Aceton gefällt, der Niederschlag ausgewaschen und getrocknet.

So konnte man ebenfalls ein weißes Pulver erhalten, das, in 40 ccm Wasser gelöst, Brenztraubensäure kräftig und rasch vergor, gegen Rohrzucker jedoch ganz unwirksam war. (Darin war Invertase in wirksamer Form enthalten.)

Demnach läßt sich Carboxylase aus Saft in ein festes Trockenpräparat überführen; dasselbe war noch nach Monaten wirksam.

Wärmetönung der Brenztraubensäuregärung.

Bekanntlich ist die Vergärung des Traubenzuckers eine wärmeliefernde Reaktion. Ob ein Teilvorgang der Zuckervergärung positive oder negative oder gar keine Wärmetönung aufweist, ist für das Problem, um das es sich hier handelt, ohne großen Belang. Immerhin war es von Interesse, die Carboxylase auch nach dieser Hinsicht zu prüfen. Da es nur darauf ankam, die Richtung des Ausschlages festzustellen, genügte folgende einfache Versuchsanordnung:

Als Calorimeter dienten zwei Dewar-Gefäße, die jetzt in Form von Thermosflaschen überall erhältlich sind. Diese wurden mit doppelt durchbohrten Gummistopfen verschlossen, durch deren eine Bohrung ein kurzes, oben in eine Capillare ausgezogenes Glasrohr geführt war. Durch die andere Bohrung des Stopfens ging ein Thermometer, das fast bis auf den Grund des Gefäßes reichte. Nun wurde die eine Flasche mit einer Emulsion von 75 g Hefe in 250 ccm Leitungswasser, die andere mit einer Aufschwemmung von 75 g Hefe in 250 ccm einer 1%igen Brenztraubensäurelösung gefüllt und beide Gefäße verschlossen. Anfangs herrschte in beiden Flaschen ungefähr die gleiche Temperatur[1]).

Wie die Tabellen ζ, η, ϑ und die mit den Hefen XII, M und K durchgeführten Versuche zeigen, gibt sich sowohl mit obergärigen als auch mit untergärigen Hefen eine deutliche positive Wärmtönung kund, und es verdient bemerkt zu werden, daß auch in dieser Beziehung die zuckerfreie Gärung der gewöhnlichen gleicht.

ζ.

Verflossene Zeit nach der Einfüllung Minuten	75 g Hefe K + 250 g 1%ige Brenztraubensäure Temperatur °C	75 g Hefe K + 250 g H_2O Temperatur °C
0	19,0	19,8
15	19,4	19,8
30	19,4	19,8
45	19,4	19,8
60	19,5	19,8
75	19,5	19,9
105	19.5	19,9
135	19,5	19,9
180	19,5	19,8

[1]) Die Ungleichheit der Anfangstemperaturen in den Parallelversuchen rührt von der Verschiedenheit der Thermometer her und resultiert aus der Zeit, die zwischen der Herrichtung beider Versuchsserien verstrich. Zuerst ist immer die Probe mit Hefe und Wasser allein eingefüllt worden. Ein kleiner Temperaturanstieg in den Ansätzen mit Hefe allein ist auf Selbstgärung zu beziehen. Die Unterschiede zwischen einer solchen Selbstgärung und der Brenztraubensäuregärung sind jedoch außerordentlich deutlich. Insbesondere bemerkt man die rasche Temperatursteigerung bei der Brenztraubensäurevergärung.

η.

Verflossene Zeit nach der Einfüllung Minuten	75 g Hefe M + 250 g 1%ige Brenztraubensäurelösung Temperatur °C	75 g Hefe M + 250 g H_2O Temperatur °C
0	31,2	33,4
10	31,5	33,4
15	31,5	33,4
25	31,6	33,4
35	31,7	33,4
50	31,8	33,4
65	31,8	33,3
70	31,8	33,2
85	31,7	33,1
200	31,6	32,8

ϑ.

Verflossene Zeit nach der Einfüllung Minuten	75 g Hefe XII + 250 g 1%ige Brenztraubensäurelösung Temperatur °C	75 g Hefe XII + 250 g H_2O Temperatur °C
6	23,5	24,4
30	24,0	24,5
60	24,0	24,5
90	24,1	24,5
100	24,2	24,5
200	24,5	24,6
260	24,5	24,6
300	24,5	24,6
360	24,5	24,6

Über die Wirkung der Carboxylase auf Oxalessigsäure.

Der Eintritt einer zuckerfreien Gärung ist außer bei Brenztraubensäure von Neuberg und seinen Mitarbeitern[1]) auch bei anderen aliphatischen und aromatischen Säuren nachgewiesen worden. Physiologisch besonders interessant sind die Ketosäuren. Ein in mancher Hinsicht beachtenswerter Vertreter dieser Gruppe ist die Oxalessigsäure, von der auch die stereoisomeren Formen, die Oxyfumarsäure und Oxymaleinsäure, von P. Mayer[2]) als gärbar befunden worden sind.

[1]) C. Neuberg und A. Hildesheimer, diese Zeitschr. **31**, 170, 1911. — C. Neuberg und L. Tier, diese Zeitschr. **32**, 323, 1911. — C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. **36**, 60 und 72, 1911; **37**, 170, 1911.

[2]) P. Mayer, diese Zeitschr. **50**, 283, 1913.

Es sollte nun geprüft werden, ob auch hier die Gärung von den lebenden Hefezellen trennbar sei und wie der Prozeß in diesem Falle bei Gegenwart von Antisepticis verlaufe. Zu diesem Zwecke wurden freie Säure (malenoide Form) sowie ihr Mono- und Dikaliumsalz[1]) in 2 $^{m}/_{10}$-Lösungen mit und ohne Chloroform zur Vergärung durch Macerationssaft angesetzt (Tabelle ι).

ι.

Vergoren	CO_2 aus gleichen Teilen Saft und Lösung allein nach		CO_2 aus gleichen Teilen Saft u. Lösung m. $CHCl_3$ nach		CO_2 aus Lösung + H_2O (8:8 ccm) nach	
	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm
Monokaliumsalz 2 $^{m}/_{10}$	10	10	5	5	0	0
Dikaliumsalz 2 $^{m}/_{10}$ . .	3	6	0,5	3	0	0
Säure 2 $^{m}/_{10}$.	nach 10 Min. ausgegoren		nach 20 Min. ausgegoren		0	1,0

Alle diese Versuche wurden bei gewöhnlicher Temperatur (14 bis 15°) vorgenommen unter steter Kontrolle wässeriger Oxalessigsäurelösungen von gleicher Konzentration; denn bei höherer Temperatur neigt die Oxalessigsäure zur Abspaltung von Kohlensäure unter Bildung von Brenztraubensäure:

$$\begin{matrix} CO.COOH \\ | \\ CH_2.COOH \end{matrix} = CO_2 + \begin{matrix} CO.COOH \\ | \\ CH_3 \end{matrix} .$$

Die Tabelle κ zeigt, daß auch mit frischen obergärigen und untergärigen Hefen die Gärung der Oxalessigsäure in Gegenwart von Chloroform ungestört vor sich geht.

κ.

Heferasse	CO_2 aus 1%iger Oxalessigsäure bei 14° nach 15 Std. ccm	CO_2 aus 1%iger Glucoselösung im Brutschrank nach 15 Std. ccm	CO_2 aus Hefe allein mit Chloroformwasser nach 15 Std. ccm
K	8	0	0
M	8	0	0
XII	8	Spur	Spur

[1]) Dargestellt unter stärkster Kühlung im Eis-Kochsalzgemisch.

Als Ergebnis obiger Untersuchungen findet man, daß die Carboxylase Oxalessigsäure und ihre Salze in analoger Weise wie Brenztraubensäure vergärt. Auch diese Oxalessigsäuregärung geht unter Bedingungen vor sich, wo Zucker der Spaltung widersteht.

Vergärung der Oxybrenztraubensäure[1]).

Die Ketonsäurebildung spielt nach unseren Anschauungen eine wichtige Rolle im intermediären Stoffwechsel. Besondere Beachtung verdient die Carbonylverbindung der Glycerinsäure, da die Systeme der Dreikohlenstoffgruppe allem Anschein nach eine besondere physiologische Bedeutung für den Zuckerauf- und -abbau im lebenden Organismus haben und da nach früheren Feststellungen außer der Brenztraubensäure auch die Glycerinsäure selbst unter bestimmten Bedingungen von Hefe angegriffen wird[2]).

Zunächst wurde die Gärfähigkeit der Oxybrenztraubensäure festgestellt[1]), indem in der bekannten Weise in den Schrötterschen Röhrchen eine $^1/_2\,^0/_0$ige Lösung der freien Säure mit den Hefen K, M und XII angesetzt wurde (Tabelle λ). Es zeigte sich hierbei, daß die untergärige Hefe K vollkommen unwirksam war, während beide obergärigen Hefen alsbald eine beträchliche Menge Gas entwickelten, das sich als Kohlendioxyd erwies.

λ.

Heferasse	CO_2 aus einer Mischung von 12 ccm Lösung mit 2 g Hefe nach		CO_2 aus einer Mischung von Hefe allein mit H_2O nach	
	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm
M	0,5	3	0	5
XII	3	5	0	5
K	0	0	0	0

Es erhebt sich nun die Frage, wie der Abbau der Oxyglycerinsäure vor sich geht.

Zwei Strukturformeln sind denkbar:

$$\text{COH.CHOH.COOH} \quad \text{und} \quad \text{CH}_2\text{OH.CO.COOH}.$$

[1]) Vgl. C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. 53, 416, 1913.

[2]) C. Neuberg und A. Hildesheimer, diese Zeitschr. 31, 176, 1911. — C. Neuberg und L. Tir, ebenda 32, 323, 1911.

In dem nach den Angaben von **Neuberg** und **Silbermann**[1]) aus Kollodium dargestellten Präparat sind jedenfalls beide isomeren Körper vorhanden; für die Wirkung der Carboxylase kommt allerdings vor allem das der zweiten Formel entsprechende Produkt in Betracht, wonach die Säure das Bild einer Oxybrenztraubensäure zeigt. Für diese Auffassung spricht auch der Gang des Abbaues der Säure.

Hatte hier die Carboxylase in der bekannten Weise gewirkt, so mußte der Prozeß folgendermaßen verlaufen:

$$CH_2OH.CO.COOH = CO_2 + CH_2OH.COH.$$

Im Gärgute mußte schließlich Glykolaldehyd nachzuweisen sein.

Der Versuch bestätigte diese Annahme.

Eine Lösung von

9,6 g oxybrenztraubensaurem Calcium,
0,2 g Ammoniumphosphat,
0,2 g Kaliumphosphat,
1,3 g Borsäure

in 1 l Wasser, der noch je 1 Kryställchen Ferrosulfat und Magnesiumchlorid zugesetzt war, wurde mit 100 g Hefe M emulsioniert und 3 Tage lang im Brutschrank der Gärung überlassen. Nun wurde klar filtriert und das Filtrat nach Zusatz von essigsaurem Phenylhydrazin für mehrere Tage in den Brutschrank gestellt. Der abgeschiedene Niederschlag wurde abgesaugt und mit 60 ccm einer $10^0/_0$igen Sodalösung $^1/_2$ Stunde lang aufs Wasserbad gestellt. Nach dem Erkalten wurde diese Mischung in einem Scheidetrichter bis zur Klärung mit Äther ausgeschüttelt und nach Trennung der beiden entstandenen Schichten die ätherische Lösung verdampft. Der Rückstand wurde aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert.

So konnten 0,72 g Substanz erhalten werden, die den richtigen Schmelzpunkt des Glyoxalosazons 169^0 zeigten. Auch die Stickstoffbestimmung ergab den für diesen Körper stimmenden Wert.

---

[1]) C. Neuberg und M. Silbermann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 142, 1905. — E. Berl und A. Fodor, Zeitschr. f. d. ges. Schieß- und Sprengstoffwesen 5, 1910.

Analyse:

0,1462 g Substanz: 29,9 ccm N (19°, 761 mm)

$C_{14}H_{14}N_4$. Ber. N = 23,53%.

Gef. N = 23,34%.

Damit ist die Vergärbarkeit der Oxybrenztraubensäure sichergestellt.

Vergärt man eine Lösung von 1%igem oxybrenztraubensaurem Calcium, so ist selbst, wenn die Gärung stattfindet, diese kaum zu erkennen, denn die H-Ionenkonzentration einer solchen Lösung ist so niedrig, daß die Acidität nicht imstande ist, Calciumcarbonat bzw. Bicarbonat zu zerlegen. Setzte man der Emulsion nach 20stündiger Gärdauer etwas Salzsäure zu, so wurde allerdings eine wahrnehmbare Menge Kohlendioxyd frei.

Daher war zu erwarten, daß in Gegenwart der Sörensenschen Puffergemische die Gärung deutlich sein würde. Das Verhalten tun die Tabellen μ und ν dar.

Gärfähigkeit von oxybrenztraubensaurem Calcium mit Borsäure gepuffert.

μ.

Heferasse	CO_2 aus einer Mischung von 12 ccm 1%iger Lösung mit 2 g Hefe nach		CO_2 aus einer Emulsion der Hefe allein mit H_2O nach	
	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm
M	3	3,5	0	5
XII	2	3	0	5

Gärfähigkeit von oxybrenztraubensaurem Calcium mit arseniger Säure gepuffert.

ν.

Heferasse	CO_2 aus einer Mischung von 12 ccm 1%iger Lösung mit 2 g Hefe nach		CO_2 aus einer Emulsion der Hefe allein mit H_2O nach	
	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm
M	0,5	3	0	5
XII	3	5	0	5

Diese Beobachtungen, die eine ziemliche Selbstgärung erkennen lassen, veranlaßten uns dazu, auch die Vergärungen der Säure in Gegenwart von Antisepticis nicht mit freier Säure oder Salzen, sondern ebenfalls mit gepufferten Lösungen[1]) und mit denselben Hefen, aber zu anderer Zeit, d. h. bei anderem Ernährungszustand, vorzunehmen.

Mit Toluol nahm überall die Gärung den gewöhnlichen Verlauf. Bei Chloroformzusatz schwankten die Resultate: in den mit Borsäure gepufferten Lösungen verlief die Gärung mit Hefe M ungestört, während sie bei Hefe XII vollständig unterbunden war. Bei den mit arseniger Säure versetzten Lösungen blieb die Kohlendioxydentwicklung in Gegenwart von Chloroform ganz aus.

Gärfähigkeit von oxybrenztraubensaurem Calcium in Gegenwart von Borsäure und Chloroform.

o.

Heferasse	CO_2 aus 12 ccm 1 %iger Lösung mit 2 g Hefe nach		CO_2 aus 12 ccm 1 %igen Chloroformwassers mit Hefe allein nach	
	20 Std. ccm	44 Std. ccm	20 Std. ccm	44 Std. ccm
M	7	8	0	0
XII	0	0	0	1

Gärfähigkeit von oxybrenztraubensaurem Calcium in Gegenwart von Borsäure und Toluol.

π.

Heferasse	CO_2 aus 12 ccm 1 %iger Lösung mit 2 g Hefe nach		CO_2 aus 12 ccm Toluolwasser mit Hefe allein nach	
	20 Std. ccm	44 Std. ccm	20 Std. ccm	44 Std. ccm
M	10	11	0,5	0,5
XII	4	4	0	0

[1]) Von der Verwendung der Phosphatgemische haben wir absichtlich Abstand genommen, daß ja die Phosphationen eine spezifisch stimulierende Wirkung auf die Gärung ausüben und daher auch bei der Selbstgärung sich in unerwünschter Weise hätten geltend machen können.

Gärfähigkeit von oxybrenztraubensaurem Calcium in Gegenwart von arseniger Säure und Chloroform.

ρ.

Heferasse	CO_2 aus 12 ccm 1%iger Lösung mit 2 g Hefe nach		CO_2 aus 12 ccm Chloroformwasser mit Hefe allein nach	
	20 Std. ccm	44 Std. ccm	20 Std. ccm	44 Std. ccm
M	0	0	0	0
XII	0	0	0	0

Gärfähigkeit von oxybrenztraubensaurem Calcium in Gegenwart von arseniger Säure und Toluol.

σ.

Heferasse	CO_2 aus 12 ccm 1%iger Lösung mit 2 g Hefe nach		CO_2 aus 12 ccm Toluolwasser mit Hefe allein nach	
	20 Std. ccm	44 Std. ccm	20 Std. ccm	44 Std. ccm
M	8	8	0,5	0,5
XII	7	8	0	Spur

Zusammenfassung.

Durch die mitgeteilten Versuche erweist sich die Carboxylase von neuem als ein gut charakterisiertes, scharf in seinen Wirkungen abgegrenztes Ferment.

Die Erhaltung des Daseins ist bei allen Lebewesen an Umsetzungen geknüpft, welche die notwendige Energie durch Spaltung von organischer Substanz liefern. Die Mehrzahl dieser Vorgänge findet in der Bildung von Kohlendioxyd ihren Ausdruck, einerlei, ob dieses durch Sauerstoffaufnahme oder intramolekulare Oxydation entsteht. Vermutlich besteht der ganze Prozeß in einer Kette von Enzymwirkungen.

In der Carboxylase ist das erste Ferment bekannt geworden, das der Loslösung von CO_2 aus Carbonsäuren dient.

Zuckerfreie Hefegärungen. XV.

Über die Bildung von n-Propylalkohol bei der Vergärung von α-Ketobuttersäure.

Von

C. Neuberg und Joh. Kerb.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

Wir hatten bereits in einer früheren Arbeit[1]) gezeigt, daß die α-Ketobuttersäure ebenso leicht wie die Brenztraubensäure durch Hefe bzw. durch Hefeenzyme unter Kohlensäureentwicklung vergoren wird. Wir erwarteten, daß bei dieser Gärung, analog dem Verlauf der Brenztraubensäurespaltung, neben der Kohlensäure Propionaldehyd entstehen würde. Jedoch konnten wir diesen Körper nur in geringer Menge erhalten (etwa 0,12 g aus 6 g Ketobuttersäure), so daß wir sogleich annahmen, daß der Propionaldehyd, an dessen intermediärer Bildung ja kaum ein Zweifel sein konnte, durch die Hefe eine weitere Veränderung, vielleicht Reduktion zu Propylalkohol, erfahre. Unterstützt wurde diese Erwartung durch folgende Beobachtung:

Wenn man eine 1%ige Ketobuttersäurelösung in einem Gärröhrchen vergären läßt, was sehr schnell vonstatten geht, und dann sofort das Gärgut nach Rimini prüft, so bekam man eine ganz kräftige Aldehydreaktion[2]). Schon nach kurzem Stehen, z. B. nach 6 Stunden, aber gab das Gärgut die Reaktion nicht mehr deutlich oder sehr abgeschwächt, zum Unterschiede von der Brenztraubensäurevergärung, wo die Aldehydprobe auch nach längerer Zeit noch positiv ausfiel. Dieses Resultat deutete

[1]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. 47, 413, 1912; 53, 417, 1913.

[2]) Wir haben schon früher (l. c. S. 415) erwähnt, daß Propionaldehyd mit Nitroprussidnatrium und sek. Amin wie Acetaldehyd reagiert. Phenylacetaldehyd dagegen gibt keine Riminische Reaktion.

also darauf hin, daß der Propionaldehyd offenbar weit leichter durch Hefe verändert wird, als der Acetaldehyd, ein Verhalten, das inzwischen auch bei anderen höheren Aldehyden, z. B. durch die Reduktion des Valeraldehyds zu Amylalkohol[1]), zutage getreten ist.

Es wurde nun folgender Versuch angestellt. 20 g reine im Vakuum destillierte α-Ketobuttersäure wurden in 2 Liter Wasser gelöst und unter Zusatz von 600 g Hefe der Rasse II (Institut für Gärungsgewerbe, Berlin) 70 Stunden bei 37° im Brutschrank belassen. Es wurde dann 1 Liter vom Gärgut übergetrieben und durch systematisches Destillieren jeweils auf die Hälfte, schließlich bis auf 65 ccm konzentriert. Diese Lösung wurde mit Pottasche übersättigt, worauf sich 21 ccm einer geistig riechenden Flüssigkeit abschieden. Diese 21 ccm wurden abpipettiert und zur Entfernung der letzten Spuren von Wasser über frisch geglühtem Kupfersulfat getrocknet. Die Flüssigkeit färbte sich dabei ziemlich stark blau. Nach 2 Tagen wurde abfiltrirt und das Filtrat aus einem kleinen Kugel-Fraktionierkolben mit hoch angesetztem Rohr vorsichtig destilliert.

Die Flüssigkeit begann bei 88° zu sieden. Die von 92 bis 99° übergehende Fraktion wurde gesondert aufgefangen. Es wurde davon eine C- und H-Bestimmung gemacht:

Abgewogen: 0,1162 g Substanz,
gef. CO_2: 0,2454 g und H_2O: 0,1330 g
entsprechend 57,57% C und 13,41% H.

Für Propylalkohol lauten die Zahlen:
60,00% C und 13,33% H.
Für Äthylalkol: 52,17% und 13,04% H.

Eine Mischung von $^2/_3$ Propyl- und $^1/_3$ Äthylalkohol hätte die Zusammensetzung 57,39% C und 13,24% H ergeben, der ziemlich gut unser Material entsprechen würde.

Der Äthylalkohol, teils in der Hefe präformiert[2]), teils durch Glykogenvergärung aus derselben entstanden, mußte nach

[1]) C. Neuberg und H. Steenbock, diese Zeitschr. 52, 494, 1913 und 59, 188, 1914.

[2]) C. Neuberg und Joh. Kerb, Zeitschr. für Gärungsphysiol. 1, 119, 1912; diese Zeitschr. 53, 413, 1913; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 46, 2227, 1913. — Vgl. auch F. Hayduck, Jahrb. d. Versuchs- u. Lehranst. für Brauerei, Berlin 1913, S. 536.

unsern früheren Erfahrungen für die angewandte Hefemenge etwa 5 bis 6 g, also zirka 7 ccm, betragen. Da wir 21 ccm Alkohol im ganzen erhalten hatten, so konnte ein derartiges Gemisch wohl vorliegen.

Zur Charakterisierung des Propylalkohols eignet sich der Naphthylcarbaminsäureester[1]), welcher aus Petroläther in schönen feinen Nadeln vom Schmelzpunkt 76° krystallisiert. Um nun festzustellen, ob aus einem Gemisch von etwa $^2/_3$ Propyl- und $^1/_3$ Äthylalkohol die reine Propylverbindung zu gewinnen wäre, wurde folgender Versuch angestellt:

1 ccm einer Mischung von 5 ccm wasserfreiem Propyl- und 2 ccm Äthylalkohol wurden in 50 ccm Petroläther gelöst und mit 4 ccm Naphthylisocyanat versetzt. Am nächsten Tage hatten sich schöne Nadelbüschel abgeschieden. Sie wurden abfiltriert, mit 40 ccm Petroläther in der Wärme gelöst und vom Rückstand abfiltriert. Es schieden sich sofort beim Erkalten feine Nadeln vom Schmelzpunkt 76° ab. Dieselben wurden nochmals umkrystallisiert, und es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen reine Propylverbindung erhalten werden kann.

3 ccm des oben erwähnten analysierten Alkohols wurden genau wie oben beschrieben behandelt. Die erhaltenen Krystalle waren zunächst etwas derb und schmolzen gegen 73°. Nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Petroläther schieden sich aber die charakteristischen feinen Nadeln ab. Sie schmolzen bei 74 bis 75°.

0,1476 g Substanz gaben 0,3966 g CO_2; 0,0864 g H_2O.
$C_{14}H_{15}O_2N$ ber.: C = 73,36 %; H = 6,55 %;
gef.: C = 73,28 %; H = 6,50 %.

Damit ist die Bildung des n-Propylalkohols durch eine zuckerfreie Hefegärung sichergestellt.

Bekanntlich findet sich im Fuselöl derselbe Alkohol. Die direkte Herleitung der α-Ketobuttersäure aus einem Naturprodukt ist bisher nicht angängig[2]). Doch ist zu untersuchen, ob n-Butylalkohol durch eine zuckerfreie Gärung der von uns gleichfalls als gärbar befundenen α-Ketoglutarsäure[2]) gewonnen werden kann.

---

[1]) C. Neuberg und E. Kansky, diese Zeitschr. 20, 445, 1909.
[2]) C. Neuberg und Joh. Kerb, diese Zeitschr. 47, 415 und 416, 1912.

Bemerkung über das Phytin.

Von

C. Neuberg.

In der neueren Literatur über das Phytin ist vielfach auf meine früheren Versuche[1]) mit dieser Substanz Bezug genommen, so bei Winterstein, Starkenstein, Jegorow, Plimmer, Page, Anderson u. a.[2])

Bis zum Jahre 1907 ist auf Grund der Arbeiten von M. S. Posternak[3]) das Phytin als ein Formaldehydphosphorsäureester, und zwar als Anhydro-oxymethylendiphosphorsäure der Zusammensetzung $C_2H_8O_9P_2$ und der Formel

$$O\begin{cases}CH_2-O-PO(OH)_2\\CH_2-O-PO(OH)_2,\end{cases}$$

aufgefaßt worden.

Posternak[3]) vertrat die Ansicht, daß der bei der Hydrolyse dieser Verbindung freiwerdende Formaldehyd sich in statu nascendi zu Inosit kondensiere.

Meine Versuche taten alsdann (1907) dar, daß entgegen dieser Annahme im Phytin der Inositring präformiert vorhanden und die Substanz als ein Inositphosphorsäureester zu deuten sei.

Über die prozentische Zusammensetzung der Phytinsalze habe ich keinerlei Angaben gemacht, sondern lediglich auf die

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 5, 443, 1907; 9, 557, 1908.

[2]) E. Winterstein, Zeitschr. f. physiol. Chem. 58, 118, 1908. — E. Starkenstein, diese Zeitschr. 30, 56, 1910. — M. A. Jegorow, diese Zeitschr. 42, 432, 1912; 61, 41, 1914. — R. H. A. Plimmer und H. J. Page, Biochem. Journ. 7, 157, 1913. — R. J. Anderson, Journ. of Biolog. Chem. 11, 471, 1912; 17, 171, 1914.

[3]) M. S. Posternak, Compt. rend. 137, 439, 1903.

Analysen Posternaks mich bezogen. „Bei Zugrundelegung der Posternakschen Analysen“[1]) gelangt man zu der Formel:

```
                    O
               ╱        ╲
         (OH₂)P          P(OH)₂
              |          |
              O          O
               ╲        ╱
                HC—CH                      = C₆H₂₄O₇P₆.
                 |   |
(OH)₂P—O—HC   CH—O—P(OH)₂
   O<             |   |          >O
(OH)₂P—O—HC—CH—O—P(OH)₂
```

$$= C_6H_{24}O_7P_6.$$

Keineswegs habe ich diese Formel als die einzig mögliche bezeichnet, sondern in meinen beiden Mitteilungen ausdrücklich angegeben, daß auch ähnliche in Betracht zu ziehen sind, „falls die Verbindung nicht überhaupt wasserärmer ist“[2]).

Der Hinweis auf diesen Passus scheint mir geboten. Er zeigt klar, daß ich die Zusammensetzung nach Anhydridformeln durchaus erwogen habe; sie war für die seinerzeit lediglich angestrebte Klassifizierung des Phytins gleichgültig.

---

[1]) Wörtlich nach dieser Zeitschr. 9, 558, 1908.

[2]) Wörtlich nach dieser Zeitschr. 5, 443, 1907 und 9, 558, 1908.

Über eine eigentümliche Art von Glucosurie.

Vorläufige Mitteilung.

Von

A. Loewy und S. Rosenberg.

(Aus dem Tierphysiologischen Institut der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin.)

(Eingegangen am 25. Februar 1914.)

Im Verlauf der Untersuchungen, in denen wir fanden, daß beim Hunde ebenso wie beim Kaninchen sensible Reize leicht zu Hyperglykämie führen[1]), sind wir aufmerksam geworden auf das Entstehen einer Hyperglykämie und Glucosurie unter Bedingungen, die, soweit wir sehen können, noch nicht bekannt zu sein scheinen.

Es handelt sich um eine kombinierte Wirkung der Extrakte bestimmter Drüsen mit innerer Sekretion und Morphin.

Führt man Hunden die Extrakte von Hypophyse (Pituitrin und Pituglandol) oder von Thyreoidea (getrocknete Drüsensubstanz beziehentlich Thyreoglandol) allein zu, so erhält man zwar positives Loewysches Phänomen, d. h. Mydriasis nach Instillation von Adrenalin ins Auge, nicht aber eine Zuckerausscheidung im Harn.

Inkorporiert man aber diese Drüsenextrakte zugleich mit Morphium in mittleren Mengen, dann erhält man Hyperglykämie und Glucosurie.

Die von uns gewählten Morphiumdosen führten allein nie zur Zuckerausscheidung, sondern hatten höchstens die Aus-

---

[1]) Vgl. diese Zeitschr. 56, 114.

scheidung einer linksdrehenden Substanz im Harn (Morphium-Glucuronsäure) zur Folge.

Zuckerausscheidung kam ferner nicht zustande, wenn an Stelle der obengenannten Drüsen Ovarial- oder Hodensubstanz allein oder mit den gleichen Morphiumdosen gepaart eingeführt wurden.

Die ausführliche Mitteilung der Experimente, sowie den Versuch, die gefundenen Tatsachen zu erklären, speziell die Gegensätzlichkeit zwischen Hypophyse und Thyreoidea einerseits und Keimdrüsen andererseits, behalten wir einer späteren Publikation vor.

Notiz zu der Mitteilung über Immunisierungsversuche mit Lipoproteinen[1].

Von

K. Landsteiner und E. Prášek.

(Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminen-Spitals in Wien.)

(Eingegangen am 10. März 1914.)

Da die Herren Izar und Mammana in einer aus einer Reihe von interessanten Mitteilungen berichten, daß es ihnen nicht gelungen ist, Immunsera gegen Lipoproteine zu erhalten, möchten wir die Gelegenheit benutzen, um zu erwähnen, daß wir mit Präparaten, die durch Behandlung von Eiweiß mit einigen Säurechloriden hergestellt waren, Immunisierungseffekte erzielen konnten.

So erhielten wir nach Injektion eines mit Acetylchlorid (ohne Alkali) in der Wärme behandelten Eiweißes Seren, die auf dieses Präparat selbst unter Komplementbindung reagierten, nicht aber unter sonst gleichen Bedingungen auf mit Benzoylchlorid (mit oder ohne Alkali) hergestellte Produkte. Umgekehrt wirkten Immunseren, die nach Injektion von mit Benzoylchlorid (ohne Alkali) behandeltem Eiweiß entstanden waren, auf dieses sowie auf ein nach Schotten-Baumann bereitetes Benzoyleiweiß[2]), aber nicht auf das Acetylchloridprodukt.

Auch mit Eiweiß, das nach der Methode von Schotten-Baumann mit Benzoylchlorid behandelt wurde, ist nach unseren

---

[1]) H. Izar und Prospero Mammana, diese Zeitschr. 59, 247, 1914.

[2]) Vgl. Blum und Umbach, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 285, 1913.

Ergebnissen eine Immunisierung doch möglich. Unter mehreren Tieren, die wir mit solchem Eiweiß injizierten, entwickelte eines ein im Komplementbindungsversuch gut wirksames Serum, das sowohl mit einem bei gewöhnlicher Temperatur (ohne Alkali) mit Benzoylchlorid behandelten Eiweiß, als mit dem zur Injektion verwendeten Präparat reagierte. Auf das Acetylchloridpräparat wirkte dieses Serum nicht ein.

Wir wollen später Genaueres über diese und ähnliche Immunsera (Verwendung anderer Säurechloride) mitteilen.

Erfahrungen mit dem Abderhaldenschen Dialysierverfahren.

Von

Carl Lange.

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für experimentelle Therapie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 20. Februar 1914.)

Über die praktische Bedeutung des Abderhaldenschen Dialysierverfahrens hat bis jetzt nach über 3 jährigem Bestehen der Methode noch immer keine Einigkeit erzielt werden können. Während auf der einen Seite Veröffentlichungen stehen, die mit der Abderhaldenschen Reaktion bei Gravidität und Carcinom in annähernd 100% richtige Resultate erzielt haben und die Lösung der wichtigsten Probleme von dieser Arbeitsmethode erwarten, stehen auf der anderen Seite Autoren, die die praktische Brauchbarkeit der Methode für klinische Zwecke kategorisch ablehnen. Dazwischen stehen die Autoren, die zwar eine absolute Spezifität der „Abwehrfermente" des Organismus nicht anerkennen, aber den Wert der Methode in gewisser Beziehung zugeben. Immerhin steht diese Gruppe von Veröffentlichungen denen näher, die die praktische Bedeutung der Reaktion gänzlich ablehnen, denn für praktisch-klinische Zwecke ist der Serumfermentnachweis, wenn keine absolute Spezifität besteht, doch wohl als unbrauchbar anzusehen.

Wir haben uns seit längerer Zeit intensiv mit dem Abderhaldenschen Dialysierverfahren beschäftigt und wollen im folgenden unsere Resultate mitteilen, die wir insbesondere bei Gravidität erzielten, da ja nach Abderhaldens eigener Aussage die Diagnostik der Schwangerschaft den Prüfstein für die gewissenhafte Ausführung der Vorschriften darstellt, gibt doch

Abderhalden an[1]), von über 600 Untersuchungen auf Gravidität nur 1 bis 2 Fehlresultate erhalten zu haben, während unter 50 Carcinomdiagnosen kein falsches Resultat mit unterlief. An anderer Stelle[2]) gibt Abderhalden an, daß im Anfang der Untersuchung eine weitgehende Spezifität nicht wahrscheinlich erschien, daß es aber überraschenderweise Abwehrfermente gibt, die streng spezifisch eingestellt sind. In diesem Stadium hat Abderhalden seine Untersuchungen über pathologische Fälle abgebrochen; immerhin müssen bei einer Anzahl von 600 Untersuchungen über das Bestehen oder Nichtbestehen einer Gravidität so viele pathologische Fälle mit untergelaufen sein, daß bei 0,15 bis 0,30 $^0/_0$ Fehlern die Spezifität auch für pathologische Fälle als genügend gesichert angesehen werden müßte.

Die praktische Durchführbarkeit der Graviditätsdiagnose ist ebenso der beste Prüfstein für die Leistungsfähigkeit der Methode selbst, da wenigstens hierbei die Unzulänglichkeiten von klinischer Seite, wie sie bei Dysfunktionen verschiedener Organe und selbst bei der Carcinomdiagnose leicht zu nicht entscheidbaren Differenzen zwischen klinischem und serologischem Befund führen können, vollkommen ausschaltbar sind. Annähernd ebenso günstige Bedingungen liefert nur noch das Tierexperiment, und auch dieses haben wir deshalb vorzüglich für unsere Untersuchungen mit herangezogen.

Wir wollen uns zunächst genau mit der von uns verwendeten Methodik befassen — wie dies ja auch Abderhalden für Publikationen auf diesem Gebiete selbst für sehr wünschenswert erachtete —, denn es kommt bei der vorliegenden Untersuchungsmethode auf die geringfügigsten Kleinigkeiten an, wie jedem bekannt sein dürfte, der sich nur ganz kurze Zeit damit beschäftigt hat.

Als schwierigster Punkt der ganzen Methodik erschien uns die einwandfreie Herstellung von Organsubstraten, da man es hierbei mit einem Gemisch der heterogensten Substanzen zu tun hat, die in ihrer Wirkung nicht immer scharf auseinander zu halten sind. Für theoretische Studien über die Brauchbarkeit der Abderhaldenschen Reaktion scheint es uns deshalb

---

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1913, S. 2774.

[2]) Münch. med. Wochenschr. 1914, S. 238.

auch geeigneter, mit artfremden Seren oder noch besser mit gereinigten Eiweißstoffen und dagegen eingestellten Immunseren zu arbeiten, weil hierbei zum mindesten die fehlerhafte Beschaffenheit des Substrates sich mit Sicherheit ausschalten läßt. Am meisten für den Anfänger in dieser Methodik dürften sich gereinigte Globuline oder Albumine aus Tierseren, die in genügender Menge von großen Schlachttieren (Rind, Pferd, Schwein) leicht zu gewinnen sind, empfehlen.

Zunächst jedoch wollen wir auf die von uns geübte Art der **Herstellung einer Placenta** für den Abderhaldenschen Versuch näher eingehen. Wir haben eine große Reihe von Placenten genau nach der Abderhaldenschen Vorschrift zubereitet, danach haben wir bei der Herstellung eine Reihe von Veränderungen vorgenommen, von deren jeder wir genau beweisen wollen, daß sie jedenfalls eine exaktere Verarbeitung im Sinne der Abderhaldenschen Vorstellungen bedeutet, damit uns nicht der Vorwurf gemacht werden kann, wir hätten willkürlich die Abderhaldenschen Vorschriften abgeändert, und unsere Resultate verlören dadurch irgendwie auch nur im geringsten an Beweiskraft.

Bei der Verarbeitung einer Placenta sind **drei Gewebsbestandteile** besonders zu berücksichtigen, die jeder für sich die Bearbeitung in verschiedenem Sinne beeinflussen, erstens, das Bindegewebe und die großen und die kleinen Blutgefäße, dann das Parenchym der Placenta: die Chorionzotten, die das eigentliche Substrat darstellen sollen, das wir möglichst isoliert gewinnen müssen, drittens die Unmenge von geronnenem Blut, die intra- und extravasculär in der Placenta eingeschlossen ist.

Schon bevor die mechanische Bearbeitung der Placenta beginnt, muß man gewisse Vorsichtsmaßregeln treffen, da die Verwendung von Placenten, die von kranken Individuen stammen, eventuell zu vollkommen falschen Resultaten führen kann. Relativ häufig gibt es zweifellos Placentaveränderungen bei Lues; bekannt ist, daß bei Lues häufig Placenten von einer Größe und exzessivem Gewicht vorkommen, die schon dadurch einen Verdacht auf Lues erwecken können. Da es sich hier zweifellos um Placenten mit pathologischen Veränderungen handelt oder wenigstens handeln kann, so sind jedenfalls, wenn man ganz sicher gehen will, derartige Placenten von vornherein

auszuschließen. Dies ist sehr leicht dadurch möglich, daß man, abgesehen von der Anamnese, deren Wert selbstverständlich in dieser Hinsicht nur sehr gering eingeschätzt werden kann, mit dem Serum der Placentaspenderin eine Wassermannsche Reaktion anstellt, und zwar um möglichst sicher Lues auszuschließen, sowohl im inaktiven als auch im aktiven Zustand; sehr empfehlenswert ist besonders für diese Untersuchungen an Graviden und Wöchnerinnen auch noch die Untersuchung mittels Bariumsulfatausschüttlung der Sera nach Wechselmann. Wo angängig, unternimmt man auch noch eine Untersuchung des Nabelschnurblutes, da Differenzen im Ausfall der Wassermannschen Reaktion bei Mutter und Kind vorkommen[1]).

Auszuschließen sind möglichst auch Placenten, deren Trägererinnen Eiweiß im Urin ausscheiden, und solche mit zahlreichen Placentarinfarkten[2]).

Außer diesen Einschränkungen, die wir keineswegs für unwichtig halten, ist natürlich zu beachten, daß die Placenta möglichst von einer Wöchnerin mit nicht zu langer Nachgeburtsperiode genommen und dann möglichst sofort verarbeitet wird.

Der erste Teil der mechanischen Bearbeitung betrifft die Entfernung der Eihäute, Fibrineinlagerungen und größeren Blutgefäße. Es ist uns bei unseren Versuchen niemals gelungen, die Placenta von der Nabelschnur oder den großen Gefäßen aus wirksam durchzuspülen, dies wäre natürlich der idealste Weg, einen großen Teil des Blutes zu entfernen.

---

[1]) Diese Vorsichtsmaßregeln sind außerdem schon deshalb nicht unwichtig, da die meisten Untersucher, die mit der Abderhaldenschen Reaktion arbeiten, gar nicht an die Möglichkeit denken, sich bei der Verarbeitung einer Placenta ganz unbekannter Provenienz syphilitisch infizieren zu können, und demzufolge eine peinliche Desinfektion nach solchen Arbeiten eventuell unterlassen. Bekanntlich fallen die häufigsten Infektionen von Ärzten auf geburtshilfliche Leistungen.

[2]) Auf einen Punkt, der mehr den Wert eines Kuriosums besitzt, wollen wir hier ganz kurz hinweisen, daß wir nämlich an einer früher einmal zu anderen Zwecken verarbeiteten Placenta einen kleinen Placentartumor fanden, der histologisch das bekannte Bild derartiger Tumoren zeigte; solche Placentartumoren sollen zwar sehr selten sein, wir selbst haben aber schon außer diesem kleinen zwei andere gesehen, die sofort durch ihre Größe auffielen; kleinere Tumoren sind vielleicht gar nicht so selten, können aber leicht der Beobachtung entgehen und eventuell auch zu Fehlresultaten führen.

Immerhin wäre aber der zahlreichen Gefäßzerreißungen wegen, auch wenn eine Durchspülung praktisch durchführbar ist, eine totale Entfernung des Blutes mit Sicherheit auf diesem Wege bei Placenten niemals zu erzielen. Statt dessen haben wir von den großen Gefäßen anfangend die Gefäße mit feiner Schere verfolgt und möglichst weitgehend herauspräpariert; diese Arbeit kann eventuell einige Stunden in Anspruch nehmen.

Abderhalden zerzupft nun die Placenta in etwa markstückgroße Stücke und quetscht diese in fließendem Leitungswasser mit dem Pistill im Mörser usw. aus. Von der Verwendung des Leitungswassers sind wir aus Gründen, auf die wir sofort eingehen wollen, gänzlich abgekommen, da man sich dabei großen Irrtümern über die „Bluthaltigkeit“ der Organe aussetzt. Es muß von der Tatsache ausgegangen werden, daß es kein Leitungswasser gibt, das nicht rote Blutkörperchen zur Auflösung bringt, wenn auch die Zusammensetzung der Leitungswässer in verschiedenen Gegenden noch so different sein mag. Wäscht man nun eine Placenta mit Leitungswasser aus, so werden die Blutkörperchen aufgelöst, das Hämoglobin kann man relativ leicht auswaschen und es bleibt bei genügender mechanischer Bearbeitung ein schneeweißes Gewebe zurück, das noch massenhaft Stromata von Erythrocyten enthalten muß. Eine mikroskopische Untersuchung der mit Leitungswasser präparierten Placentarstücke auf etwa vorhandene Erythrocytenstromata an Zupf- oder Schnittpräparaten kann uns darüber keinen Aufschluß geben. Wer häufig Blutkörperchenschatten im Urin und anderen Körperflüssigkeiten zu sehen Gelegenheit hatte, der weiß, daß es unmöglich ist, im Zupf- oder Schnittpräparat einzelne Blutkörperchenstromata zu erkennen.

Um nun zu entscheiden, welche Bedeutung den zweifellos in großer Menge im Substrat zurückbleibenden Blutkörperchenstromata zukommt, stellten wir folgende Versuchsreihe an. Wir verwendeten menschliche Seren, die koagulierte serumfreie Menschenblutkörperchen abbauten, und prüften sie auf Abbau reinen Stromata gegenüber. Ausnahmslos ließ sich feststellen, daß Seren, die koagulierte Blutkörperchen abbauten, dies auch koagulierten Stromata gegenüber taten.

Die Blutkörperchen wurden so gewonnen, daß defibriniertes

Menschenblut 5mal mit Kochsalzlösung an der Zentrifuge ausgewaschen wurde, und der gewonnene Blutkörperchenbrei dann genau wie eine Placenta nach Abderhaldens Vorschriften weiterbehandelt wurde. Dieses Substrat diente uns gleichzeitig für eine theoretisch sehr wichtige Kontrolle, ob nämlich unspezifischer Abbau von Placenten durch das Serum nicht Gravider regelmäßig auf die Koinzidenz von bluthaltigen Organen und blutabbauenden Seren zurückzuführen sei, wie wir später sehen werden, ist dies nicht der Fall. Bei der Bereitung des Blutkörperchensubstrates muß man sehr sorgfältig nach jedem Auskochen die Koagula sehr fein im Mörser zerreiben, da es sonst nicht gelingt, das Substrat einwandfrei „ninhydrinfrei zu kochen“.

Die Stromata wurden teils nach der Sachsschen Vorschrift gewonnen: defibriniertes Blut wurde mehrfach mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, dann im Wasserbade so lange auf 60° erhitzt, bis die Mischung lackfarbig wurde, mit destilliertem Wasser versetzt zur totalen Auflösung, das Gesamtvolumen wieder mit konzentrierter Kochsalzlösung auf den Gehalt einer physiologischen Kochsalzlösung gebracht und dann die Stromata scharf abzentrifugiert, darauf noch mehrmals gründlich nachgewaschen. Teils wurden die Stromata so hergestellt, daß gewaschene Blutkörperchen mit destilliertem Wasser aufgelöst und dann die Stromata mittels Säureagglutination durch Citratgemische ausgeflockt und weiter verarbeitet wurden. Die letztere Methode ist weit bequemer zur Erzielung genügender Mengen absolut hämoglobinfreier Blutkörperchen-Stromata.

Aus den in dieser Weise angestellten Versuchen ergibt sich unwiderleglich die Tatsache, daß Seren, die Blutkörperchen abbauen, dies auch isolierten Stromata gegenüber tun, was ja auch nach serologischen Erfahrungen weiter nicht auffallen kann, da auch spezifische Immunhämolysine nur das Stroma auflösen, das in Lösung gegangene Hämoglobin jedoch vollkommen unbeeinflußt lassen.

Die Versuche mit säureagglutinierten Erythrocytenstromata haben außer der bequemen Technik auch noch die Bedeutung, daß bei dieser Art der Herstellung die Leukocyten mit großer Wahrscheinlichkeit ganz oder größtenteils ausgeschaltet werden.

Es handelt sich hier also um Versuche mit äußerst rein dargestellten Substraten, wie sie für die Theorie des Dialysierverfahrens in größerem Umfange wünschenswert erscheinen müssen.

Als praktische Schlußfolgerung für eine einwandfreie Substratdarstellung ergibt sich demnach die Möglichkeit, daß man eine Placenta mit Leitungs- oder destilliertem Wasser so auswaschen kann, daß das Gewebe vollkommen weiß erscheint, daß sich spektroskopisch kein Blutfarbstoff mehr nachweisen läßt und daß trotzdem in den Placentarstücken noch eine Unmenge Blutkörperchenstromata zurückblieben, die das eigentliche „Substrat" der abzubauenden Blutkörperchen darstellen.

Wir stellen demnach die obligate Forderung auf, was übrigens auch schon andere Untersucher taten, die Entfernung des Blutes — d. h. der intakten roten Blutkörperchen — nur mit physiologischer Kochsalzlösung vorzunehmen.

Es stellte sich bei derartigen Versuchen nun sehr bald heraus, daß es unendlich viel schwieriger ist, eine Placenta bei Verwendung physiologischer Kochsalzlösung vollkommen weiß zu waschen als mit destilliertem oder Leitungswasser; der beste Beweis dafür, daß beim Auswaschen mit Leitungswasser — teilweise wenigstens — nur das Hämoglobin ausgelaugt und die Stromata zurückgelassen werden, ist die Tatsache, daß es beim mechanischen Zerpressen der Placentarstücke mit physiologischer Kochsalzlösung etwa 5 bis 10 mal so lange dauert, bis man ein vollkommen weißes Gewebe bekommt, als wenn man destilliertes oder Leitungswasser verwendet. Ja, es war uns bei Ausführung der genau befolgten Abderhaldenschen Vorschriften überhaupt nicht möglich, die Placentarstücke bei Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung vollkommen weiß zu erhalten.

Abderhalden verwendet noch relativ große Placentarstücke, was schon aus der Vorschrift entnommen werden kann, daß die Placentarstücke aus der Aufbewahrungsflasche mit einer Pinzette entnommen werden können; wenn man derartig große Stücke mit physiologischer Kochsalzlösung wäscht, dann zerkleinert und mit destilliertem Wasser auspreßt, so geht immer noch Hämoglobin in Lösung. Um ein Organ mit physiologischer Kochsalzlösung einigermaßen blutfrei zu erhalten, ist deshalb

von vornherein eine weitergehende Zerkleinerung unbedingt nötig, als sie bei der Zerquetschung im Mörser erzielt werden kann.

Wir verwendeten deshalb bei einer Reihe von Placentarbereitungen den Zerkleinerungsapparat von Latapie, der Placenta in eine außerordentlich feine Emulsion zu verteilen gestattet. Nun wäre ja der Einwand möglich, daß hierbei das gesamte Placentargewebe gleichmäßig in feine Stückchen zerteilt wird, so daß man nicht imstande ist, wie bei der Zerreibung im Mörser, Blutgefäße und Bindegewebe als faserige Stränge herauszusuchen und zu entfernen, dem würde man sich natürlich aussetzen, wenn man das Placentargewebe einfach im Latapie zerkleinert, dann auswäscht und preßt. Das Bindegewebe läßt sich hierbei jedoch nach unseren einwandfreien Erfahrungen weit besser entfernen als bei der Verarbeitung im Mörser, bei der, wie man sich mikroskopisch überzeugen kann, die Gefahr außerordentlich groß ist, daß man, je länger die Verreibung im Mörser ausgedehnt wird, um so gründlicher beim Dekantieren der Waschflüssigkeit die Chorionzotten bis auf geringe Reste entfernt und immer mehr reines Bindegewebe übrig behält, das dann durch seine rein weiße Farbe als vollkommen einwandfrei gewaschenes Substrat imponieren kann.

Bei unserer Methode der Placentabearbeitung wird erstens so viel als möglich vom Bindegewebe vor der Zerkleinerung im Latapie durch Präparieren entfernt, dann aber läßt der dünne Brei, der zunächst hellrotbraun aus dem Latapie herauskommt, eine sehr gute Abtrennung des Bindegewebes ohne Verlust an eigentlichem Parenchym zu. Man erhält nämlich einen ganz feinen Brei, in dem makroskopisch nur noch längere und kürzere Bindegewebsstreifen in der sonst homogenen Masse erkennbar sind. Die Bindegewebsteile werden nämlich durch eine größere Nummer des Latapieschen Apparates nicht vollkommen durch die Ringmesser zerkleinert, sondern sie werden mehr durch die Siebteile hindurchgequetscht. Die Bindegewebsteilchen sind selbstverständlich nicht so groß, daß man sie einzeln mit der Pinzette herauslesen kann, aber sie unterscheiden sich von dem feinen Brei des Parenchyms doch ganz wesentlich durch Größe und Schwere. Gibt man nun den ganzen Brei mit physiologischer Kochsalzlösung in sehr hohe und schmale Zylinder, so setzen sich die größeren und schwereren Bindegewebsbe-

standteile sehr schnell zuerst ab, während die eigentlichen Chorionzottenbestandteile oben schwimmen, durch wiederholtes Abschlämmen erhält man ein sehr bindegewebsfreies Substrat, das um so besser ausfällt, je mehr man von den untersten Schichten verwirft. Die feinsten Teilchen bestehen größtenteils aus Chorionzotten, und diese Bestandteile werden beim Zerreiben im Mörser und Abgießen der Waschflüssigkeit ständig weggeschüttet; um nun empfindliche Verluste an eigentlichem Substrat zu vermeiden, muß man bei der Zerkleinerung im Mörser oder durch Latapie das Waschwasser entweder zentrifugieren oder filtrieren. Das Zentrifugieren der gewaschenen Suspensionen ist bei Verwendung von Kochsalzlösung als Waschflüssigkeit nicht zu empfehlen, da es erstens bei Verarbeitung größerer Substratmengen sehr zeitraubend ist und außerdem den erstrebten Zweck: Ausschaltung der intakt gebliebenen roten Blutkörperchen, nicht erreichen lassen kann. Da aber rote Blutkörperchen engste Filter, z. B. auch die gehärteten Papierfilter in dickster Aufschwemmung mit Leichtigkeit passieren, empfiehlt sich zur Entfernung des oft gewechselten Waschwassers das Filtrieren. Als Filtermaterial bevorzugten wir engmaschige weiße Seide, die vorher in destilliertem Wasser energisch ausgekocht wurde, weil hiermit das Filtrieren ohne Verlust recht rasch vonstatten geht und außerdem die Seide gegen mechanische Beanspruchung sehr widerstandsfähig ist. Wir benutzten regelmäßig eine automatische Filtriervorrichtung, wie sie sich in jedem Laboratorium mit Leichtigkeit zusammenstellen läßt.

Auf diesen Punkt, nämlich Filtration des Waschwassers, legen wir sehr großen Wert, weil sonst immer mehr an spezifischem Substrat verloren geht, je intensiver eine Placenta ohne diese Vorsichtsmaßregel im Mörser zerrieben wird. Bei Nichtbeachtung dieser Verhältnisse können nicht selten selbst bei vorgerückter Schwangerschaft negative Resultate erzielt werden.

Auf die beschriebene Weise behandelte Placenten geben nach Kochen Substrate von einer Weiße, wie man sie bei Zerreibung im Mörser niemals auch nur annähernd erzielen kann.

Wir haben bei unseren Versuchen teils auf diese Weise zubereitetes Material verwendet, als auch solches, das genau

nach den Vorschriften von Abderhalden verarbeitet war. Die Vorteile unseres Verfahrens in jeder Richtung liegen auf der Hand, da hier alle drei wesentlichen Bedingungen erfüllt werden können: Entfernung der gesamten Blutkörperchen ohne Zurücklassung von Stromata (soweit dies Postulat sich praktisch überhaupt erfüllen läßt), Entfernung des Bindegewebes und Vermeidung des Verlustes an spezifischem Substrat.

Das Verfahren von Öller und Stephan, Zerteilung der Placenta in Gefrierschnitte und Ausschüttlung in physiologischer Kochsalzlösung, haben wir nicht angewendet, teils aus dem Grunde, weil dies Verfahren so zeitraubend ist, daß es für größere praktische Versuchsreihen kaum in Frage kommt, teils deshalb, weil hier das gesamte Bindegewebe mit den Blutgefäßen im Substrat verbleibt. Immerhin halten wir diesen Vorschlag für äußerst beachtenswert.

Da Abderhalden den größten Nachdruck darauf legt, daß die Placenta vollkommen blutfrei ist, legten wir bei Herstellung und Prüfung der Placenta den Hauptwert auf diesen Punkt. Als die einzig mögliche Kontrolle in dieser Richtung wird von Abderhalden der Versuch angegeben, die zu prüfende Placenta mit dem Serum eines Tieres, das gegen menschliche Blutkörperchen immunisiert ist, anzusetzen und auf Abbau zu prüfen. Abderhalden gibt unseres Wissens nirgends an, welche Resultate er mit dieser Kontrolle erzielt hat. Die Spezifität der Serumfermente vorausgesetzt, müßte diese Kontrolle zu einwandfreien Resultaten führen; wir haben nun mit den zuerst von uns zubereiteten Placenten öfters Versuche in dieser Richtung angestellt, die meist positiv ausfielen, im ganzen aber zu eindeutigen Resultaten nicht führten, da die präparierten Kaninchenseren zuweilen auch nach Entfernung der Antimenschenblutamboceptoren durch Adsorption an gewaschene Menschenblutkörperchen bei Eisschranktemperatur noch „positiven Abbau“ zeigten; die Amboceptoren waren nach dieser Behandlung nachweislich entfernt. Die Verhältnisse in dieser Richtung liegen demnach keineswegs einfach, entweder die Menschenblutamboceptoren sind ganz andere Körper als die Serumfermente, was wenig wahrscheinlich ist, oder die Serumfermente im Serum eines gegen Menschenblutkörperchen immu-

nisierten Kaninchens sind keineswegs spezifisch auf Blutkörperchen eingestellt, was mehr Wahrscheinlichkeit für sich hat, obwohl auch noch andere Möglichkeiten in Frage kommen.

Jedenfalls muß konstatiert werden, daß die von Abderhalden vorgeschlagene Kontrolle zur Prüfung eines Organs auf Blutfreiheit keineswegs ohne weiteres praktisch verwendbar ist, wahrscheinlich ist es überhaupt nicht möglich, ein Organ „blutfrei", d. h. auch frei von Blutkörperchenstromata zu waschen; Abderhalden gibt jedenfalls nicht an, wie es ihm je gelungen ist, diese Forderung zu erfüllen. Wir werden weiter unten noch auf eine Möglichkeit zu sprechen kommen, in geeigneten Fällen den Nachweis zu erbringen, daß der positive Abbau der Placenta nicht durch Bluthaltigkeit derselben bedingt sein kann, wenn nämlich Seren Placenta abbauen, die koaguliertes Menschenblut allein nicht abbauen.

Auch bezüglich des Auskochens der Organe möchten wir auf einzelne Punkte hinweisen, die unseres Wissens bis jetzt noch nicht betont wurden. Ausgehend von Versuchen über die Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion anderen Reaktionen gegenüber sowohl für den Nachweis genuiner Eiweißkörper, als auch für deren Abbauprodukte bis zu den Aminosäuren herunter, fiel sofort die äußerst geringe Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion zum Nachweis genuiner Eiweißkörper auf. Die Gründe dafür sind von anderer Seite an verschiedenen Stellen genügend klargelegt, und wollen wir deshalb nicht weiter auf die Ursachen eingehen.

Verwendet man als genuines Eiweiß z. B. Pferdeserum, so bleibt die Ninhydrinreaktion — bei Dosierung nach Abderhalden — bei einer Verdünnung von $^1/_{300}$ bis $^1/_{400}$ in physiologischer Kochsalzlösung negativ, während andere empfindliche Eiweißreaktionen Pferdeserum z. B. in Verdünnung von $^1/_{800}$ noch nachweisen. Als empfindliche Reagenzien hierfür verwendeten wir Sulfosalicylsäure, die Hellersche Probe, Spieglers Reagens, Essigsäure-Ferrocyankali, Eßbachs Lösung, Almen, Asaprollösung. Die Essigsäure-Ferrocyankaliprobe und die Spieglersche gewinnen enorm an Feinheit, wenn man sie als Schichtprobe ausführt; bei Spieglers Reagens ist das möglich, wenn man zur Vermehrung des spezifischen Gewichts dem Reagens einen größeren Gehalt an Kochsalz beimengt, dann ist

leicht eine scharfe Überschichtung und bequemes Ablesen der Ringbildung möglich. Die Hellersche Probe läßt sich dadurch noch enorm verfeinern (übrigens auch andere dieser Proben), daß man die Eiweißlösung bei saurer Reaktion eindampft; das Acidalbumin läßt sich bei der Hellerschen Probe ebenso durch Ringbildung nachweisen. Die Feinheit der Reaktion ist daher zum Teil auch abhängig von dem Quantum an verdünnter Eiweißlösung, das zur Verfügung steht, nicht nur von der Konzentration, wie bei der Ninhydrinreaktion, wo man außerdem zur Anstellung der Reaktion einer peinlich exakten neutralen Reaktion bedarf.

Stehen von der zu prüfenden Lösung 20 ccm zur Verfügung und dampft man diese auf $^1/_2$ ccm ein, ein Quantum, das zur Anstellung der Hellerschen Reaktion vollkommen genügt, so fällt die Schichtprobe noch positiv aus, wenn man eine Pferdeserumverdünnung von $^1/_{50000}$ gebraucht, d. h. wenn in den 20 ccm sich $^1/_{2500}$ ccm Pferdeserum befand. Wir kommen später noch auf diese Verhältnisse zurück.

Diese Umstände spielen für das einwandfreie Auskochen der blutfrei gewaschenen Organe eine große Rolle. Wir konnten nämlich feststellen, daß Organe, die nach Abderhaldens Vorschrift fehlerfrei ausgekocht waren, d. h. nach 5 Minuten dauerndem Auskochen mit minimaler Wassermenge im Filtrat keine positive Ninhydrinreaktion mehr ergaben, trotzdem immer eine positive Eiweißreaktion zeigten (Almen, Spiegler usw.). Um was für Körper es sich hierbei handelt, ist nicht ohne weiteres zu entscheiden, jedenfalls ist anzunehmen, daß diese auskochbaren Substanzen, die in klare Lösung gehen bei geringer Konzentration und durch kein Filtermaterial zurückgehalten werden, den denaturierten genuinen Eiweißkörpern sehr nahe stehen und jedenfalls keine tieferen Abbauprodukte darstellen können. Wir versuchten nun, um auch in dieser Richtung gleichmäßige Resultate zu erlangen, die Placenta so lange auszukochen, bis das Filtrat keine der oben angegebenen Eiweißreaktionen mehr gäbe; das Resultat war, daß es sich niemals erreichen ließ, eine Placenta mit destilliertem Wasser so auszukochen, daß sie keine gelösten Eiweißkörper (im weiteren Sinne) mehr an das Kochwasser abgab. Wir kochten Placenten stunden- und tagelang am Rückflußkühler, immer mit demselben Effekt, je länger die

Placenta mit destilliertem Wasser gekocht wurde, eine um so stärkere Reaktion gab das — übrigens meist vollkommen wasserklare — filtrierte Kochwasser mit den oben angeführten Eiweißreagenzien, während die Ninhydrinprobe nach 5 Minuten langem Kochen negativ ausfiel.

Es lag nahe, anzunehmen, daß die Gewebseiweißkörper ungenügend koaguliert seien. Nach Abderhaldens Vorschrift kocht man die blutfrei gewaschenen Organe mit der 100 fachen Menge destillierten Wassers, und es empfiehlt sich, auf 1 l Wasser etwa 5 Tropfen Eisessig zuzugeben. Kocht man auf diese Weise Eiweißkörper, z. B. Pferdeserum, zentrifugiert das denaturierte Eiweiß ab und kocht es weiter minutenlang mit destilliertem Wasser, so kann man das Präcipitat ganz oder teilweise wieder „in Lösung bringen", die ein Hartfilter glatt passiert. Aus diesen Gründen versuchten wir eine exaktere Koagulierung der Eiweißkörper des Placentargewebes.

Zu diesem Zwecke kochten wir gewaschene Placenta in starken Kochsalzlösungen unter Zusatz von Essigsäure; bei einem reichlichen Gehalt an Kochsalz kann man einen größeren Überschuß an Essigsäure nehmen, ohne die Bildung von löslichen Acidalbuminen befürchten zu müssen. Es wurde nun 10 Minuten bis mehrere Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann durch häufiges Nachkochen mit viel destilliertem Wasser das Kochsalz und eventuell überschüssige Essigsäure ausgekocht; bei 5 Minuten langem Kochen mit destilliertem Wasser zeigte sich immer positive „Eiweißreaktion" im filtrierten Kochwasser, die bei längerem Kochen noch intensiver wurde. Dasselbe Resultat erzielten wir, wenn wir das Placentargewebe zwecks Koagulation ein oder mehrere Male kürzere oder längere Zeit am Rückflußkühler mit absolutem Alkohol kochten; auch die sonst so ausgezeichnete Koagulation mit Kochen unter Zusatz von Trichloressigsäure ergab kein anderes Resultat. Etwas besser werden die Resultate, wenn man das Placentargewebe mit geglühtem Natriumsulfat so lange zerreibt, bis ein vollkommen weißes trockenes Pulver entsteht — was übrigens äußerst mühsam ist — und dieses Pulver dann durch mehrstündiges Kochen mit absolutem Alkohol am Rückflußkühler zur Koagulation bringt.

Die Alkoholbehandlung bedingt nun aber Differenzen gegen-

über dem Kochen mit Wasser allein: wir konnten mit Sicherheit feststellen, daß Organe, die in Alkohol gekocht, und auch solche, die versuchsweise zwecks Konservierung in absolutem Alkohol aufbewahrt wurden, statt in sterilem, destilliertem Wasser unter Zusatz von Chloroform und Toluol, von positiv reagierenden Seren häufig viel schwerer „abgebaut" wurden als solche Orgene, die nur in Wasser gekocht waren. Dieser Punkt verdient einige Beachtung bei Verwendung von lipoidreichen Substraten (Gehirn, Tuberkelbacillen usw.), die vor ihrer Verwendung nach Abderhaldens eigenen Angaben erst einer längeren Fettextraktion unterzogen werden müssen.

Unsere eben geschilderten Beobachtungen über den eigenartigen Koagulationszustand der gekochten Organe sind vielleicht geeignet, einige Punkte zu klären. Aufgefallen ist uns immer, wieso ein Organ, das tadellos sterilisiert in steriler Flasche, noch dazu mit Toluol und Chloroform versetzt, in kurzer Zeit eine Zersetzung erfahren sollte, die doch bei sicherer Zerstörung sämtlicher autolytischen Gewebsfermente nur eine bakterielle sein könnte. Das Wiederauftreten einer positiven Ninhydrinreaktion bei Auskochen einer aufbewahrten, früher als einwandfrei befundenen Placenta tritt manchmal so schnell auf, bei sicherem Ausschluß bakterieller Fäulnis, daß diese nicht der einzige Grund dafür sein kann, wie es Abderhalden immer betont.

Wenn eine bakterielle Infektion sterilisierter Eiweißkörper — noch dazu bei Vorhandensein von Toluol und Chloroform — so leicht möglich wäre, wären wir überhaupt nicht imstande, sterilisierte Nährlösungen für bakteriologische Zwecke monate-, eventuell jahrelang aufzubewahren, ohne eine Verunreinigung befürchten zu müssen. Wenn größere Organstücke vor der Auskochprobe zerkleinert werden, geben sie leicht wieder eine positive Ninhydrinreaktion. Sehr häufig tun sie es jedenfalls, wenn man, wie es nicht selten vorgekommen sein mag, des Guten eher zu viel als zu wenig tut und länger als 5 Minuten das Substrat auskocht, was ja vollkommen im Sinne der Abderhaldenschen Vorschriften gehandelt wäre, falls man annimmt, daß aus vollkommen koaguliertem Eiweiß nur unkoagulable Peptone usw. durch Auskochen entfernt werden sollen. Länger als 5 Minuten zu kochen wäre deshalb nicht

fehlerhaft, weil dies dem von Abderhalden empfohlenen Eindampfen des filtrierten Kochwassers in der Wirkung vollkommen gleichsteht.

Daß eine positive Ninhydrinreaktion wieder bei der Auskochprobe auftritt, weil eine Zerkleinerung des Substrats stattgefunden hat, läßt sich übrigens mit Sicherheit ausschließen, wenn man ganz fein verteilte Placenta nach unseren obigen Angaben verwendet.

Es ist nicht anders möglich, als daß manchmal eine positive Reaktion mit Ninhydrin bei sicherem Ausschluß von Infektion und weiterer Zerkleinerung des Organs gar nicht auf das Vorhandensein von dialysablen ninhydrinreaktiongebenden tieferen Eiweißspaltprodukten zurückzuführen ist, sondern daß die positive Ninhydrinreaktion bei der Auskochprobe durch Körper bedingt sein kann, die den denaturierten genuinen Eiweißkörpern nahestehen. Diese Körper können unter den gegebenen Bedingungen in vollkommen wasserklarer Lösung in solcher Menge vorhanden sein, daß sie trotz der Unempfindlichkeit der Ninhydrinreaktion diesen hochmolekularen Körpern gegenüber eine positive Reaktion bedingen können; hiervon kann man sich zugleich durch den eventuell äußerst stark positiven Ausfall mit den eigentlichen Eiweißreagenzien überzeugen.

Die logische Schlußfolgerung aus diesen experimentellen Ergebnissen ist die, daß die Auskochprobe des Organs mit Ninhydrinreaktion gar nicht zu beweisen braucht, daß sich dialysable Eiweißspaltprodukte im Kochwasser befinden, für deren mögliches Entstehen wir auch gar keine Erklärung finden können, sondern daß so viel koagulierte hochstehende Eiweißkörper beim Kochen „in Lösung gehen“ können, die, wie wir uns einwandfrei überzeugen konnten, nicht dialysabel zu sein brauchen.

Wenn man diese Auffassung anerkennt, so wird damit der Wert der Auskochprobe als einer Kontrolle, die vor jedem Versuch unbedingt angestellt werden muß, um das Vorhandensein von Eiweißspaltprodukten im Substrat auszuschließen, ziemlich illusorisch, da eine positive Ninhydrinreaktion unter den gegebenen Bedingungen nicht ausnahmslos durch immer wieder entstehende Eiweißspaltprodukte bedingt sein kann.

Der entscheidende Wert käme vielmehr der von Abderhalden vorgeschriebenen Kontrolle zu, daß ein Multiplum der im eigentlichen Versuch verwendeten Placentamenge keine dialysablen ninhydrinpositiven Stoffe gegen destilliertes Wasser in genügender Menge abgeben darf, wenn sich das Substrat ebenfalls in destilliertem Wasser befindet.

Wir glauben demnach, daß der Auskochprobe nur der Wert einer ersten Orientierung zukommt, solange anfangs oder nach schlechter Aufbewahrung des Substrats noch Eiweißspaltprodukte in demselben vorhanden sein können; die eigentliche Substratkontrolle müßte aber die Dialysierprobe bleiben, die erste ohne die letztere würde theoretisch nicht genügen, abgesehen davon, daß selbstverständlich die Kontrolle der Dialyse eines Multiplum von Placenta in destilliertem Wasser gegen destilliertes Wasser keineswegs die Bedingungen bei der eigentlichen Reaktion in einer für eine Kontrolle genügenden Weise reproduziert und daher auch nur sehr bedingten Wert haben kann, wie wir noch zeigen werden.

Es könnte nun für praktische Zwecke gleichgültig erscheinen, ob man eine Kontrolle zuviel macht (um etwaigen Mißverständnissen zu begegnen, betonen wir gleich, daß wir sie nie außer acht ließen, was ja auch immer leicht zu erfüllen ist), da dadurch falsche Resultate nicht erzielt werden können.

Immerhin ist ein Punkt zu beachten: auf Grund der Abderhaldenschen Vorstellungen kommt man zu der Anschauung, daß ein Hauptfehler bei Versagen der Reaktion in der fehlerhaften Aufbewahrung der Organe liegen könne, die immer wieder bakteriell zersetzt werden und von Eiweißspaltprodukten durch sehr energisches Auskochen mit destilliertem Wasser befreit werden müßten. Daß in einer Placenta bei der ersten Verarbeitung Albumosen, Peptone usw. vorhanden sein können, ist selbstverständlich; bei guter Aufbewahrung können sie sich, einmal entfernt, nicht wieder bilden. Wir kochen nun aber eine Unmenge Eiweiß aus der Placenta heraus, und man könnte glauben, je intensiver man eine Placenta auskocht, desto besser müßte es sein; das verhält sich aber nicht so, denn je mehr man kocht, desto mehr Eiweiß geht in Lösung und wird mit dem Kochwasser weggegossen, desto mehr Bindegewebs bleibt zurück. Es stellt sich hier dasselbe Verhältnis heraus wie bei

der Zerreibung der ungekochten Placenta im Mörser zwecks Entfernung des Blutes: je länger man das Kochen und Zerreiben ausdehnt, um so mehr verarmt das Substrat an spezifischen Bestandteilen, und um so eher bleibt reines Bindegewebe zurück. Besonders werden beim energischen Auskochen die Nucleoproteide, denen noch am ersten eine chemische Organspezifität zukommen dürfte, vollkommen entfernt. Vermeiden läßt sich dies Auskochen des Eiweißes auf keine Weise, eventuell würde es sich empfehlen, die ersten Aufkochungen der Placenta unter Zugabe von reichlich Kochsalz und Essigsäure vorzunehmen, da dadurch Albumosen und Peptone ja nicht koaguliert werden und restlos ins Kochwasser übergehen können. Das überschüssige Kochsalz und die Essigsäure könnte man dann durch einige Male wiederholtes Auskochen mit destilliertem Wasser leicht vollkommen entfernen.

Am wichtigsten scheint uns jedenfalls die Tatsache, daß man sich bei einem Versuch nicht auf die Auskochprobe allein verlassen darf, wenn man sie als einzige Kontrolle neben der Serumkontrolle verwenden wollte. Wir kommen auf diese Verhältnisse noch später zurück.

Nach der Herstellung und dauernden Kontrolle des verwendeten Organsubstrats bleibt der wichtigste Punkt die Prüfung und dauernde Kontrolle der Dialysierhülsen; während eine Darstellung der idealen Organsubstrate technisch unmöglich ist, werden hier zweifellos viele Fehler gemacht, die sich bei genügender Sorgfalt vermeiden lassen.

Weniger bedeutungsvoll, aber natürlich unerläßlich, ist die Prüfung der Hülsen auf Durchlässigkeit für genuines Eiweiß, da relativ selten Hülsen vorkommen, die genuines Eiweiß passieren lassen. Als genuines Eiweiß verwendet man Eiereiweiß oder Serum; am besten hat sich uns Pferdeserum nach fraktionierter Sterilisierung empfohlen, das von Schlachttieren, d. h. nachdem die Tiere sicher einige Zeit gehungert hatten, gewonnen wurde. Zur Prüfung des Dialysats auf Eiweiß verwendet Abderhalden merkwürdigerweise nur die Biuret- und Ninhydrinreaktion, wobei er die Biuretreaktion als empfindlichste Probe auf genuines Eiweiß unbedingt empfiehlt. Nun gibt es aber fraglos für genuines Eiweiß viel feinere Reagenzien als die Biuretreaktion, die Ninhydrinprobe kommt als empfind-

liches Reagens zum Nachweis von genuinen Eiweißkörpern überhaupt nicht in Frage. Am meisten verwendet haben wir zur Prüfung des Dialysats auf genuines Eiweiß: Spieglers Reagens in Schichtprobe, Almen, Sulfosalicylsäure und Asaprol. Dem Asaprol kommt auch insofern Bedeutung zu, weil es ein sehr empfindliches Reagens für Albumosen und Peptone ist; für den Nachweis von Albumosen in sehr geringen Mengen ist auch Pikrinsäure sehr empfindlich und gibt noch positive Ausschläge, wo die Ninhydrinreaktion bereits negativ ist. Für den Peptonnachweis ist Ninhydrin bereits ziemlich empfindlich, Asaprol kommt ihm aber hier an Empfindlichkeit fast noch gleich. Die Ninhydrinreaktion ist konkurrenzlos in der Feinheit des Nachweises der Aminosäuren; wir kommen auf diesen Punkt noch weiter unten zurück.

Bei der Prüfung der Hülsen auf Eiweißdurchlässigkeit konnten wir nun feststellen, daß die Schlauchart 579 A von Schleicher & Schüll fast ausnahmslos für Eiweiß (fraktioniert bei 55^0 sterilisiertes, hämoglobinfreies Pferdeserum oder Eiereiweiß) undurchlässig ist; als Reagens wurde Spiegler, Almen oder Sulfosalicylsäure benutzt. Hülsen, die bei dieser Prüfung die geringste positive Reaktion zeigen, müssen selbstverständlich verworfen werden. Als auffälligen Widerspruch mit unseren eigenen Erfahrungen finden wir die Bevorzugung der Biuretreaktion zum Nachweis von genuinem Eiweiß; sowohl für uns als mehrere andere Untersucher ist der Unterschied zwischen dem Ausfall der Biuretreaktion und den oben angeführten Reagenzien für genuines Eiweiß ausnahmslos so eklatant, daß die Biuretreaktion als feines Eiweißreagens daneben gar nicht in Frage kommt; wir fanden bis jetzt keinen Untersucher, der mit der Biuretreaktion für genuines Eiweiß auch nur annähernd so feine Ausschläge erzielte als mit den von uns gebrauchten Reagenzien.

Bei der Verwendung von Eiereiweiß ist außerdem noch ein Punkt zu berücksichtigen, daß man nämlich sehr selten weiß, wie frisch ein Ei ist, dessen Eiklar man für die Hülsenprüfung verwenden will; es kann nun durch autolytische Prozesse im Ei ein Eiweißabbau stattgefunden haben, so daß dialysable Eiweißspaltprodukte die Hülse passieren und eine positive Biuretreaktion bedingen können, denn bei eventuell eben

erkennbarer Biuretreaktion ist es selbstverständlich unmöglich, eine Eiweißreaktion von einer Peptonreaktion durch den mehr violetten oder rötlichen Schein zu unterscheiden. Diese Fehlermöglichkeit fällt natürlich bei dem von uns meist bevorzugten Pferdeserum (bei unseren späteren Untersuchungen verwendeten wir stets Pferdeserum und Eiereiweiß nacheinander), das sterilisiert, also auch inaktiviert war und häufig auch in bereits dialysiertem Zustande zur Hülsenprüfung verwendet wurde, vollkommen weg.

Sollte es aber wirklich Untersucher geben, für die die Biuretreaktion selbst für genuines Eiweiß feiner sein sollte als z. B. Spieglers Reagens — Abderhalden spricht sich in der dritten Auflage seines Buches über diesen Punkt nicht aus —, so kann die Prüfung mit Spieglers Reagens oder Sulfosalicylsäure doch auf jeden Fall als absolut einwandfreies Reagens bei der Prüfung der Hülsen auf Eiweißdurchlässigkeit betrachtet werden, wovon wir uns durch folgende Versuche überzeugen konnten.

Maßgebend für die Prüfung der Dialysate bei der Ausführung der eigentlichen Reaktion bleibt die Prüfung mit Ninhydrin, die Biuretreaktion kann hierfür nicht in Frage kommen, weil — ganz abgesehen von der geringen Empfindlichkeit der Biuretreaktion zum Peptonnachweis — beim Zustandekommen einer positiven Ninhydrinreaktion bei positivem Abbau eines Substrates offenbar zu einem gewissen Teil auch abiurete Spaltprodukte beteiligt sind, worauf wir noch später zurückkommen. Diese Möglichkeit wird auch von Abderhalden zugegeben, trotzdem empfiehlt er noch heute für die Dialysatprüfung im eigentlichen Versuch die Biuretreaktion. Bei Verwendung der Biuretreaktion in diesem Falle an Stelle des Ninhydrins fallen über 50% positive Reaktionen aus, und die übrigen haben auch nicht annähernd die Sicherheit, wie sie der leicht erkennbare Ausfall einer positiven Ninhydrinreaktion gewährt.

Nun ist aber, wie schon genügend betont, das Ninhydrin für genuines Eiweiß ein äußerst unempfindliches Reagens, so daß die Spuren von genuinem Eiweiß, die eventuell durch eine fehlerhafte Hülse hindurchdiffundieren und dem Nachweis durch Spieglers Reagens in Schichtprobe entgangen sein könnten,

für den Ausfall der Ninhydrinreaktian im eigentlichen Versuch vollkommen vernachlässigt werden können. Mit Ninhydrin kann man Pferdeserumeiweiß vielleicht noch in einer Verdünnung von $^1/_{8000}$ (Eiweißgehalt nicht Serumverdünnung) nachweisen, mit Spiegler bei Überschichtung in einer Verdünnung von $^1/_{130000}$ bis $^1/_{150000}$.

Die Ninhydrinreaktion ist nun aber, was man bei allen diesen Untersuchungen nie vergessen darf, eine Schwellenreaktion, die nichts über die Abwesenheit reaktionsgebender Stoffe besagt, sondern nur, daß dieselben nicht in genügender Konzentration vorhanden sind, um positive Reaktion zu bedingen. Man muß also dicht an diese Schwelle herangehen, wenn man die Abwesenheit von Stoffen beweisen will, die den Ausfall der Reaktion nach der positiven Seite hin beeinflussen könnten.

Sehr geeignet für diesen Nachweis ist eine Peptonlösung in einer solchen Konzentration, daß sie eben keine Spur von Ninhydrinreaktion mehr gibt. Mischt man nun 10 ccm einer solchen genau unterwertigen Peptonlösung mit 10 ccm einer Verdünnung von Pferdeserum, die eben mit Spieglers Reagens keine Reaktion mehr erkennen läßt, dampft auf 10 ccm ein und kocht mit 0,2 ccm 1 $^0/_0$ Ninhydrinlösung eine Minute — dies entspricht genau den Verhältnissen der Abderhaldenschen Reaktion —, dann bleibt die Ninhydrinreaktion ausnahmslos negativ. Danach kann es als einwandfrei bewiesen gelten, daß für die Zwecke der Hülsenprüfung auf Eiweißdurchlässigkeit die Prüfung des Dialysats mit einem der oben angegebenen Eiweißreagenzien als vollkommen einwandfrei angesehen werden muß; die Ninhydrinprobe dagegen zwecks Prüfung der Hülsendurchlässigkeit für Eiweiß muß als durchaus ungenügend angesehen werden.

Bei der Prüfung der Hülsen auf Eiweißdurchlässigkeit und auch bei Anstellung der eigentlichen Reaktion verwendet Abderhalden destilliertes Wasser als Dialysenflüssigkeit und nicht etwa physiologische Kochsalzlösung; nun ist ja allgemein bekannt, daß bei dieser Versuchsanordnung die Globuline des Serums ausgefällt werden und für die Dialyse nicht mehr in Betracht kommen. Für die Prüfung der Hülsen auf Eiweißdurchlässigkeit mag dies keine große Rolle spielen, da die bei

der Dialyse gegen destilliertes Wasser ausfallenden Globuline sowieso durch Dialysiermembranen schwerer hindurchdiffundieren als die jedenfalls in Lösung bleibenden Albumine.

Für die eigentliche Abderhaldensche Reaktion liegen die Verhältnisse aber ganz anders. Erstens ist es bekannt, daß die meisten Immunitätsreaktionen an die Globulinfraktion des Serums gebunden sind, oder besser gesagt, da diese Bezeichnung nicht ganz zutrifft, an die Eiweißkörper, die bei Dialyse gegen destilliertes Wasser aus ihrer Lösung ausfallen; innerhalb der für die Abderhaldensche Reaktion vorgeschriebenen Versuchsdauer und bei der dort gegebenen Anordnung werden die „Globuline“ also tatsächlich ausgefällt, ob ganz oder nur teilweise, lassen wir dahingestellt.

Wir konnten uns nun bei Anwendung der Abderhaldenschen Methodik auf eine experimentell möglichst einfache Fragestellung davon überzeugen, daß die durch Dialyse und Zentrifugieren von den „Globulinen“ befreiten Albumine eines Immunserums ihre abbauende Fähigkeit ganz oder teilweise verloren hatten. Es kann demnach als ziemlich sicher angesehen werden, daß dem Ablauf der Serumfermentreaktion, durch die in der Versuchsanordnung vorgeschriebene Dialyse gegen destilliertes Wasser ein vorzeitiges Ende bereitet wird, es müßte denn sein, daß die „Fermente“ sehr bald an das vorgelegte Substrat verankert würden und dort ihre Wirkung entfalten könnten, auch wenn die Globuline durch Dialyse gegen destilliertes Wasser ausgefällt werden. Für diese mögliche Verankerung der Abwehrfermente an das vorgelegte Substrat sprechen einerseits — wenigstens in gewisser Beziehung — Versuche, die wir analog der Amboceptorbindung mit Blutkörperchen vornehmen, andererseits scheint eine derartige Verankerung z. B. beim „Abbau“ von Organen keine große Rolle zu spielen, wofür folgende Versuche sprechen. Nimmt man z. B. nach einiger Zeit — ein bis mehreren Stunden — die Placentarstücke aus einem sicher positiv reagierenden Serum heraus und legt sie nach kurzem Abspülen und Abzentrifugieren in physiologische Kochsalzlösung, dann ist kein Abbau, oder doch nur ein ganz minimaler, im weiteren Verlauf zu konstatieren. Andererseits nimmt nach einer bestimmten Zeit die Stärke der Ninhydrinreaktion bei Dialyse gegen destilliertes Wasser nicht mehr zu,

während ein derartiges Fortschreiten des Abbaus proportional der Zeit bei Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung zu erkennen ist. Diese Versuche sind dadurch etwas schwer zu beurteilen, da die quantitative Schätzung des Ausfalls einer positiven Ninhydrinreaktion ganz feine Abstufungen kaum zuläßt.

Immerhin wollen wir darauf hinweisen, daß es uns in keiner Weise ersichtlich ist, warum Dialyse gegen destilliertes Wasser vorgeschrieben ist, wo doch zweifellos Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung das zu untersuchende Serum in seinen Eigenschaften weniger verändern würde, und der Gehalt von 0,85 $^0/_0$ Kochsalz die Ninhydrinreaktion auch in keiner Weise beeinträchtigt.

Bei der Prüfung der Hülsen auf gleichmäßige Durchlässigkeit für Eiweißabbauprodukte müssen wir ganz besonders auf einige Punkte hinweisen, die bisher der Beachtung entgangen zu sein scheinen. Als wichtigste Frage bei der Hülsenprüfung, die das Hauptinteresse der ganzen Methodik beansprucht, schien uns von Anfang an eine Markierung jeder einzelnen Hülse, damit über jede Hülse fortlaufend Protokoll geführt werden könne, weil sonst nachweisbar Irrtümer nicht mit Sicherheit vermieden werden können, wie wir gleich zeigen werden.

Eine derartige Markierung ist ganz sicher und einwandfrei dadurch zu erreichen, daß man an den oberen Rand der Hülse mit einer stumpfen Feder, am besten Federkiel, um die Schicht möglichst wenig zu verletzen, mit chinesischer Tusche eine nicht zu kleine Zahl aufschreibt. Diese Zahl kann die ganze Versuchsanordnung nachweisbar in keiner Weise stören; sie liegt am obersten Rand der Hülse, ragt also fast immer noch über die Toluolschicht empor, und chinesische Tusche kann selbst in größeren Mengen, als sie hier in Frage kommen, eine Ninhydrinreaktion nicht beeinflussen. Diese Markierungszahlen sind relativ haltbar, doch müssen sie von Zeit zu Zeit, bevor sie unleserlich werden, nachgezogen werden. Wir konnten auf diese einfache Weise von Anfang an die Veränderungen an einer Hülse sehr genau verfolgen, wodurch wir im Verein mit anderen Vorsichtsmaßregeln, auf die wir weiter unten noch zu sprechen kommen werden, Hülsenfehler in geeigneten Fällen vollkommen ausschließen konnten. Die Hülsen wurden erst markiert, nachdem sich bei der Prüfung auf Eiweißdurchlässig-

keit ihre Brauchbarkeit — wenigstens in dieser Richtung — erwiesen hatte. Wir spülten die Hülsen nach einmaligem Gebrauch öfters unter der Wasserleitung aus und gaben sie dann auf längere Zeit in ein großes Glas, dessen Drahtdeckel eine Durchbohrung aufwies, in der ein Wasserschlauch gut festgehalten wurde. Läßt man nun einen starken Wasserstrahl durch das Glasgefäß hindurchstreichen, so bleiben die Hülsen in ständiger starker Bewegung, ohne fortschwimmen zu können, während bei Ausspülung im Siebe unter der Wasserleitung einzelne Hülsen ganz ohne Wasserwechsel bleiben, auch wenn man stundenlang spült. Bei unserer Art der Ausspülung muß man hohe Glasgefäße nehmen und die Hülsen luftleer vollkommen mit Wasser gefüllt untertauchen, damit sie nicht gegen das Drahtnetz des Deckels scheuern, wodurch ihre Schicht verletzt werden könnte. Auf diese Weise gelingt die Reinigung der Hülsen gut, ohne daß die geringste Beaufsichtigung notwendig wäre.

Das Kochen der Hülsen vor Gebrauch soll nach Angaben Abderhaldens (3. Aufl. S. 150) höchstens $^1/_4$ Minute lang in siedendem Wasser erfolgen, an anderer Stelle (S. 155) gibt Abderhalden 30 Sekunden langes Kochen an. Beim Kochen werden nun nachweislich die Hülsen dichter und verändern sich allmählich immer mehr.

Auf diesen Punkt muß exakt geachtet werden, da hier eine große Fehlerquelle entsteht, wenn man sich auch genauestens an die Abderhaldenschen Vorschriften hält; immerhin sind diese Vorschriften in dieser Hinsicht auch nicht eindeutig, da eine Kochdauer von $^1/_4$ oder $^1/_2$ Minute im Verlauf von vier Wochen, während welcher die Hülsen nach Abderhalden nicht nachgeprüft werden, schon zu erheblichen Differenzen führen muß.

Seite 183 schreibt Abderhalden: „Die Hülsen müssen etwa aller vier Wochen wieder geprüft werden. Stellen sich schon früher Fehldiagnosen ein, und sind andere Fehler ausgeschlossen, so prüfe man sofort die Hülsen auf Eiweißdurchlässigkeit und gleichmäßige Durchlässigkeit für Peptone.“

Daraus ergibt sich nach Abderhaldens eigenen Angaben, daß bei dieser Vorschrift zur Hülsenprüfung Fehldiagnosen möglich sind, die natürlich nur in den Fällen aufgedeckt werden

können, wo es sich um klinisch einwandfrei diagnostizierbare Fälle handelt (z. B. positiver Abbau von Placenta durch Serum eines Mannes); in solchem Falle wird man ohne weiteres auf das falsche Resultat aufmerksam, prüft die Hülsen noch einmal und kann dann eventuell mit neu geeichten Hülsen das zweitemal eine richtige Diagnose stellen.

Ganz anders liegen aber die Verhältnisse, wenn man praktischen Nutzen aus der Untersuchungsmethode ziehen will. Wenn man z. B. einen verdächtigen Fall auf Carcinom untersucht, so wird der durch einen Hülsenfehler entstandene falsche serologische Befund nicht ohne weiteres durch den klinischen Befund korrigiert, man erhält unweigerlich eine Fehldiagnose. Die Bedingungen des letzten Falles sind nun aber die maßgebenden, weil eine serologische Methode als wertlos angesehen werden müßte, wenn sie nicht ohne klinischen Befund eine Diagnose gestattet.

Wir haben aus den angeführten Gründen eine genauere Prüfung der Hülsen vorgenommen, die wir gleich beschreiben werden; vorher wollen wir aber beweisen, daß die eben angegebene Möglichkeit kein theoretisch konstruierter Fall ist, sondern unter den gegebenen Versuchsbedingungen leicht und oft vorkommen kann und muß.

Nach Abderhalden kann man eine Hülse vier Wochen lang ohne Nachprüfung gebrauchen; wir wollen nun annehmen, die Hülse sei in diesen vier Wochen nur 20 mal zu Versuchen gebraucht worden. Nach Abderhaldens Vorschriften (S. 155) mag diese Hülse nun 20 mal 30 Sekunden in kochendes Wasser getaucht sein. Da nun Abderhalden die Hülsen von einmal festgestellter gleichmäßiger Peptondurchlässigkeit ohne weitere Markierung in einer Flasche aufbewahrt, kann und wird es vorkommen, daß zu einem Versuch zwei Hülsen gebraucht werden, von denen die eine nur einmal 30 Sekunden in kochendes Wasser getaucht war, die andere dagegen 20 mal. Behandelt man nun versuchsweise zwei Hülsen von einmal festgestellter gleichmäßiger Peptondurchlässigkeit so, daß man die eine einmal, die zweite jedoch 20 mal 30 Sekunden kocht und wieder spült, so zeigen sich meist erhebliche Differenzen, die schon bei geringerem Unterschied in der Kochzeit auftreten können. Bekommt man nun in einen Versuch für die Serum-

kontrolle eine weniger durchlässige, d. h. öfter gekochte Hülse, für die eigentliche Reaktion (Serum + Organ) dagegen eine selten gekochte Hülse, so kann sich mit Leichtigkeit ein falsches Resultat ergeben. Diese Möglichkeit konnten wir bei einwandfreier Innehaltung der Abderhaldenschen Vorschriften öfter künstlich herbeiführen, so daß unseres Erachtens diese Art der Hülsenprüfung als nicht genügend angesehen werden muß.

Bei der von uns geübten Hülsenmarkierung ist es nicht möglich, daß Hülsen, die verschieden oft gekocht wurden, ohne Kontrolle in einem Versuche gleichzeitig verwendet werden, da wir bei jedem Versuch die Hülsennummer notieren, und also über jede einzelne Hülse — nicht nur über eine größere oder kleinere Gruppe — fortlaufend orientiert sind, wie sie verwendet wurde und wie sie sich in den einzelnen Versuchen bewährte.

Wenn man die Hülsen nicht direkt mit Nummern versehen will, was wir möglicher Verwechslungen wegen immer für das zweckmäßigste halten, so kann man auch die Hülsen einzeln für sich in Eprouvetten aufbewahren, doch ist dies insofern mißlich, als man dann nicht gemeinsam spülen kann. Jedenfalls muß man darüber orientiert sein, welches Individuum einer Gruppe von Hülsen man jedesmal vor sich hat.

Wir konnten uns nun aber sehr bald überzeugen, daß auch dieses gleichmäßige Behandeln der Hülsen nicht genügt, um gleichmäßige Resultate zu erzielen. Wenn man eine Gruppe von Hülsen vier Wochen lang gebraucht, kann man es bei Nachprüfung erleben, daß man jetzt fünf bis sechs Gruppen verschiedener Durchlässigkeit vor sich hat.

Als notwendige Konsequenz ergab sich für uns die Folgerung, die allerdings sehr viel Arbeit verursachte, die Hülsen jedesmal vor einem Versuch auf Peptondurchlässigkeit zu prüfen. Auf Eiweißdurchlässigkeit prüften wir nicht jedesmal wieder von neuem, da es uns nie vorkam, daß eine einmal in dieser Hinsicht einwandfrei befundene Hülse nachher Eiweiß durchließ; dies würde auch deshalb zu großen Schwierigkeiten führen, weil man dann wieder für jede neue Hülsenprüfung zwei Tage gebrauchen würde, während sich die jedesmalige Prüfung auf gleichmäßige Peptondurchlässigkeit eben einfach nicht umgehen

läßt. Nach Abschluß eines Versuchs werden die Hülsen sofort gespült, mit Pepton angesetzt und sind am nächsten Tage wieder zum Gebrauch fertig.

Bei der vorzunehmenden Hülsenprüfung auf gleichmäßige Durchlässigkeit von Peptonen müssen aber noch andere Punkte berücksichtigt werden. Gibt man 2,5 ccm 1 %iger Lösung von Seidenpepton Höchst in eine Dialysierhülse und läßt 16 Stunden gegen destilliertes Wasser dialysieren, so ergibt sich eine äußerst kräftige Blaufärbung bei der Ninhydrinreaktion, und zwar in einem Grade, wie sie bei positivem Organabbau durch Seren fast niemals erreicht wird. Nun ist es objektiv unmöglich, feine Farbdifferenzen hierbei in einer so starken Konzentration ebenso scharf zu unterscheiden, als wenn man mit verdünnteren Farbkonzentrationen arbeitet, auch liegen die Bedingungen bei der eigentlichen Reaktion so, daß man nicht zwei sehr intensiv blau gefärbte Röhrchen miteinander zu vergleichen hat, sondern eine Flüssigkeit, die farblos ist oder einen eben erkennbaren violetten Schimmer zeigt, mit einer zweiten vergleicht, die vielleicht, was ja zur positiven Reaktion genügt, eben eine Spur intensiver gefärbt ist. Gibt man zu zwei derartigen Röhrchen, die eine eben erkennbare minimalste Differenz zeigen, so viel Pepton hinzu, daß eine so starke Blaufärbung bei der Ninhydrinreaktion erzielt wird, wie sie im Dialysat einer 1 %igen Peptonlösung auftritt, dann ist ausnahmslos diese feine Differenz vollkommen unkenntlich geworden. Umgekehrt kann man sich auch sehr leicht davon überzeugen, daß zwei starke Reaktionen, die nicht zu unterscheiden sind, sofort eine deutliche Differenz erkennen lassen können, wenn man auf das 3- bis 5 fache mit Wasser verdünnt.

Es ist demnach als sicher anzunehmen, daß bei der Prüfung der Hülsen mit 1 %iger Lösung von Seidenpepton Differenzen in der Peptondurchlässigkeit übersehen werden können und müssen, die im eigentlichen Versuch fälschlicherweise zu einem positiven Resultat führen können, wenn die durchlässigere Hülse für den Versuch Serum + Organ benutzt wurde. Diesen Fehler kann man nur dadurch vermeiden, daß man die Hülsen mit viel dünneren Peptonlösungen auf Peptondurchlässigkeit prüft, also etwa mit 0,1 bis 0,3 %. Es kommt nun bei mindestens 20 % der geprüften Hülsen vor, daß Hülsen mit

0,2 % Pepton Differenzen erkennen lassen, die, mit 1 % Pepton angesetzt, in keiner Weise zu unterscheiden waren; die auf diese Weise aufgedeckten Differenzen würden im eigentlichen Versuche selbstverständlich genügen, einen positiven Organabbau anzunehmen, da ja nach Abderhalden das geringste Plus im Dialysat Serum + Organ für ein positives Resultat genügt.

Um keine Irrtümer aufkommen zu lassen, bemerken wir, daß wir selbstredend auch stets Versuche peinlichst nach den Originalvorschriften Abderhaldens angestellt haben. Alle in der Arbeit enthaltenen, von der Originalvorschrift abweichenden Untersuchungen sind nur vorgenommen in der Absicht, Fehlerquellen zu entdecken und zu vermeiden, um den Abderhaldenschen Ideengang eventuell besser in die Praxis umsetzen zu können.

Bei der Beschickung der Hülsen gingen wir mit besonderer Vorsicht zu Werke; da man vollkommen steril arbeiten soll (nur steriles destilliertes Wasser, sterile Kölbchen, Hülsen, Organe, Pinzetten. Pipetten usw.), so wird diese erstrebte Asepsis sofort vollkommen illusorisch, wenn man die Hülsen, nachdem sie ausgekocht und nur mit sterilen Pinzetten angefaßt wurden, wieder mit den Händen anfaßt oder mit Leitungswasser in Berührung bringt. Die Beschickung der Hülsen läßt sich auch ohnedies vollkommen aseptisch ausführen. Erstens spülten wir die Hülsen aus einer Standflasche mit sterilem destilliertem Wasser aus, und vermieden es vollkommen, die Hülsen mit den Händen zu berühren. Das wasserdichte Zuklemmen der Hülse besorgten wir mit einer ausgekochten Metallklemme, deren schmale, lange Brauchen mit Gummischlauch überzogen sind, so daß eine Verletzung der Hülsenschicht vollkommen ausgeschlossen war. Wir müssen außerdem bemerken, daß es uns nie gelang, eine Hülse mit den Fingern allein so abzuschließen, daß eine Verunreinigung des Hülseninhalts mit Spülwasser vermieden werden konnte. Benutzt man versuchsweise färbende Lösungen zum Spülen, so kann man sich sehr leicht davon überzeugen, daß bei Verschluß mit dem Finger immer etwas Spülwasser in den unteren Hülsenteil gelangt; verwendet man nun Leitungswasser zum Spülen, so wird der Schlauchinhalt infiziert, und es muß betont werden, daß die Überschich-

tung mit Toluol eine Vermehrung von Bakterien im Serum bei einer 16 stündigen Bebrütung bei 37° nicht mit Sicherheit verhindert[1]).

Leitungswasser muß demnach beim Ausspülen der Hülsen unbedingt vermieden werden, ebenso das Berühren der Hülsen mit den Fingern, nachdem sie einmal ausgekocht sind. Um hier gleich die Frage der Hülsenbeschickung vollkommen zu erledigen, wollen wir noch bemerken, daß wir bei der Einbringung von Organ und Serum in die Hülsen besondere Vorsichtsmaßregeln trafen, um eine Verunreinigung der oberen Hülsenteile, die eventuell nicht unter Toluol zu stehen kommen, sicher zu vermeiden. Das zwischen sterilem Fließpapier abgepreßte Organ wurde durch ein Glasrohr gleich auf den Boden des Dialysierschlauchs mit Platinnadel deponiert, das sonst unvermeidliche Verschmieren der oberen Hülsenteile wird auf diese Weise sicher ausgeschaltet. Das Serum wurde niemals mit dem Munde aufgesogen, sondern immer mit einer Pipette, die mit dem Weichardtschen Sicherheitssauger versehen war. Die Vorteile dieses Saugers sind offensichtlich, denn man kann mittels desselben aus einem Zentrifugenglas, das noch einen Bodensatz von roten Blutkörperchen enthält, Serum absaugen, ohne befürchten zu müssen, das Sediment aufzurühren, da man die Entnahme genau mit dem Auge kontrollieren kann, was bei Aufsaugen mit dem Munde nie sicher gelingt. (Bemerken möchten wir hier jedoch gleich, daß wir niemals Serum zum Versuch aus einem Zentrifugierröhrchen entnahmen, das noch ein sichtbares Blutkörperchensediment erkennen ließ, sondern daß wir das Serum so oft umfüllten, bis sich nach längerem Zentrifugieren kein Bodensatz mehr bildete; dies diente gleichzeitig als Kontrolle auf absolute Abwesenheit von Blutkörperchen.) Andererseits ist es mit diesem Sauger möglich, das Serum, ohne die Pipette ausblasen zu müssen, in genauest dosierbarer Menge auf dem Boden des Schlauches auslaufen zu lassen, ohne den Hülsenrand zu berühren. Wir gaben das

[1]) Wenn man eine Bakterienkultur mit Toluol überschichtet, nicht durchschüttelt, so wird das Wachstum in den unteren Schichten anscheinend fast gar nicht gehemmt. Dies ist auch dann noch der Fall, wenn die Höhe des flüssigen Nährbodens ca. $1^1/_2$ bis 2 cm beträgt, wie es den Verhältnissen bei der Abderhaldenschen Reaktion entspricht.

Serum immer zuerst in die Hülse für die Serumkontrolle und dann in die Hülse, die bereits das Substrat enthielt, weil man, besonders wenn das Substrat sehr fein verteilt ist (Placentarpulver, Bakterien), sehr leicht etwas von dem Substrat in die Serumkontrolle hinüberbringt, und wir hätten dann in beiden Hülsen annähernd die gleichen Versuchsbedingungen.

Um das eben Ausgeführte kurz zusammenzufassen, so halten wir eine Hülsenprüfung auf gleichmäßige Peptondurchlässigkeit vor jedem Versuch für unbedingt notwendig, sonst müssen Fehldiagnosen mit unterlaufen; ebenso müssen Fehldiagnosen entstehen, wenn man statt der von uns zur Kontrolle verwendeten 0,2 %igen Peptonlösung die Hülsen nur mit einer 1 %igen Lösung von Seidenpepton auf gleichmäßige Peptondurchlässigkeit prüft.

Diente die eben angegebene Methodik nur dazu, Veränderungen bei der einzelnen Hülse nicht zu übersehen, so müssen wir hier noch auf einen Punkt der Hülsenprüfung hinweisen, der bis jetzt vollkommen unbeachtet blieb.

Abderhalden schreibt vor (S. 155), daß man bei der Prüfung der Hülsen auf Peptondurchlässigkeit eine vorwiegende Gruppe von Hülsen erkennt, die eine gleichmäßige Ninhydrinreaktion ergeben, nur diese Hülsen werden zu den Versuchen aufbewahrt, alle übrigen aber verworfen. Überlegen wir uns nun die praktischen Konsequenzen dieses Verfahrens: nehmen wir an, wir prüften eine Serie von 20 Hülsen auf Peptondurchlässigkeit und finden 7 von absolut gleicher Stärke der Ninhydrinreaktion. Nehmen wir nun eine zweite Gruppe von 20 Hülsen, so finden wir darin 7 bis 8 von absolut gleichmäßiger Durchlässigkeit, die sich jedoch von der Durchlässigkeit der ersten Gruppe unterscheidet; die Durchlässigkeit in der ersten Gruppe sei *a*, in der zweiten *b*. In der ersten Gruppe finden sich immer Hülsen von der Durchlässigkeit *b*, diese müssen aber verworfen werden, in der zweiten Gruppe sind Hülsen von der Durchlässigkeit *a*, diese müßten ebenfalls verworfen werden. Je nachdem wir nun mit der einen oder anderen Gruppe anfangen, erhalten wir eine Standardhülse von der Durchlässigkeit *a* oder *b*; nach Abderhalden dürfte nur eine Durchlässigkeit verwendet werden, dies ist aber vollkommen illusorisch, da es keine Möglich-

keit gibt, nur eine Hülsenart von bestimmter Durchlässigkeit in allen Versuchen zu verwenden, da wir kein objektives Maß für diese Durchlässigkeit haben.

Es läßt sich auf keine Weise vermeiden, daß verschiedene Untersucher mit Hülsen verschiedener Durchlässigkeit arbeiten, und auch bei dem gleichen Untersucher muß es dazu kommen, daß er zu verschiedenen Zeiten mit verschiedener Durchlässigkeit arbeitet, auch wenn er bestrebt ist, sich absolut genau an diese Vorschrift zu halten, die in keiner Weise durchführbar ist, und einmal Hülsen verwirft, die ein anderes Mal als Standardhülsen angesehen werden müssen.

Prüft man 100 Hülsen auf ihre gleichmäßige Peptondurchlässigkeit, so findet man manchmal nur 20 oder noch weniger, die eine absolut gleichmäßige Durchlässigkeit für Pepton besitzen; nach öfterem Kochen besitzt nun ein Teil dieser Hülsen eine geringere Durchlässigkeit, müßte also eigentlich verworfen werden. Um diese Forderung Abderhaldens zu erfüllen, müßte man stets Tausende von Hülsen verarbeiten, um immer nur wenige zum Versuch zu behalten, außerdem mit dem Effekt, daß diese Arbeit, die aufgewendet wird, um immer nur mit derselben Hülse zu arbeiten, nutzlos ist, da ein anderer Untersucher mit einer ganz anderen Hülsendurchlässigkeit arbeitet. Man sieht demnach, eine Standardhülse gibt es nicht und kann es nicht geben; die Forderung Abderhaldens ist undurchführbar und kann auch theoretisch gar nicht das erreichen, was sie eigentlich bezwecken soll.

Man muß demnach logischerweise so vorgehen, daß man nicht nur mit Hülsen von einer Durchlässigkeit arbeitet, die ja auch gar nicht in einem absoluten Maße festzulegen ist, sondern daß man die sicher eiweißundurchlässigen Hülsen in verschiedene Gruppen teilt, in deren jeder eine absolut gleichmäßige Durchlässigkeit festgestellt wurde; bei Veränderungen nach öfterer Benutzung kann dann nach wieder vorgenommener Prüfung eine Hülse aus der einen in die andere Gruppe herübergenommen werden.

Es ist sichergestellt, daß man bei genauer Befolgung der Abderhaldenschen Vorschriften (S. 155) zu Hülsengruppen mit verschiedener Durchlässigkeit gelangen muß. Es ist nun eine Frage von großer Bedeutung, ob man mit Hülsen ver-

schiedener Durchlässigkeit auch im eigentlichen Versuch differente Resultate erzielen kann[1]).

Theoretisch müßte man ja als selbstverständlich voraussetzen, daß die Hülsen mit größter Peptondurchlässigkeit, wenn sie nur absolut sicher eiweißundurchlässig sind, die geeignetsten wären, da mit ihrer Hilfe am leichtesten der jeweilige Substratabbau wird erkannt werden können.

Da es immer sehr große Differenzen in der Peptondurchlässigkeit verschiedener Hülsen gibt, so stellten wir Versuche an, ob derartig differente Hülsen auch innerhalb der eigentlichen Versuchsanordnung zu verschiedenen Resultaten führen können; dies ist in der Tat der Fall, wie ja auch vorauszusehen war.

Da wir den Versuch mit möglichst vielen differenten Hülsen unter genau gleichen Verhältnissen ansetzen wollten, verdauten wir Pferdeserum mit sehr wenig Trypsin, und zwar wurden die Mischungsverhältnisse so ausprobiert, daß nach 16stündigem Aufenthalt im Brutschrank mitteldurchlässige Hülsen verschiedene Reaktionsstärken der Ninhydrinproben im Dialysat ergaben. Bei starkem und mittlerem Abbau zeigten sämtliche Hülsengruppen im Prinzip übereinstimmende Resultate. Wurden nun die Versuchbedingungen so eingerichtet, daß die mittleren Hülsen eine eben erkennbare Ninhydrinreaktion zeigten, so versagten die schwach durchlässigen. Bei derartig eingerichteten Versuchsbedingungen, daß die stärkst durchlässigen Hülsen eben erkennbare Ninhydrinreaktion ergaben, versagten die mittel- und schwachdurchlässigen. Die stärkst durchlässigen Hülsen erwiesen sich für diesen Versuch durch folgende Kontrolle als einwandfrei: Das Pferdeserum wurde in ebenso stärkst durchlässigen Hülsen mit durch Erhitzen inaktiviertem Trypsin angesetzt; die Differenz zwischen dem Versuch mit aktivem und inaktiviertem Trypsin war deutlich.

---

[1]) Um Mißverständnissen vorzubeugen, betonen wir hier nochmals, daß wir im vorliegenden Falle differente Hülsen nicht so verstehen, daß der eigentliche Versuch Serum + Organ und die Serumkontrolle mit differenten Hülsen angesetzt werden können — hierauf bezogen sich die früheren Ausführungen —, sondern auch unter Ausschluß der dort angeführten Fehler besteht die Möglichkeit, daß zwei Gesamtversuche mit differenten Hülsengruppen angesetzt werden können.

Gleiche Verhältnisse konnten wir mit Sicherheit an einem Antieiweißserum feststellen, von dem wir größere Mengen gleichzeitig zur Verfügung hatten. Aus diesen Versuchen kann man eigentlich den Schluß ziehen, daß eine Hülse um so geeigneter für den Versuch ist, je durchlässiger sie für Pepton ist, absolute Undurchlässigkeit für Eiweiß natürlich vorausgesetzt. Da wir uns jedoch auf die gleichen Versuchsbedingungen wie alle übrigen Untersucher einstellen wollten, schalteten wir die stark durchlässigen und sehr wenig durchlässigen Hülsen aus (die letzteren z. B. vereiteln jede Frühdiagnose) und verwendeten nur Hülsen mittlerer Durchlässigkeit. Da es praktisch undurchführbar war, mit nur einer Durchlässigkeitsgrenze zu arbeiten, verwendeten wir drei Gruppen, die untereinander kaum merklich differierten. Die mittlere Durchlässigkeit war so festgestellt worden, daß die Hülsendurchlässigkeit, die am häufigsten unter 100 geprüften Hülsen vorgekommen war, zugrunde gelegt wurde, es waren übrigens nur 16 derartige Hülsen festgestellt worden. Nach 14 tägigem Gebrauch waren nur noch acht Hülsen vollkommen gleich, man müßte demnach sehr schnell die Hülsen ersetzen und viele Hunderte von Hülsen verwerfen, um nur einige wenige stets für die nötigen Versuche vorrätig zu haben. Von den ausgewählten drei Gruppen wurden nun die Hülsen vor jedem Versuch auf Peptondurchlässigkeit geprüft und zu den beiden Versuchen: Serum + Substrat und Serum allein immer nur zwei Hülsen genommen, die auch nicht die geringste Differenz im Ausfall der Ninhydrinreaktion bei Verwendung von 0,2 % Seidenpepton erkennen ließen.

Bei der Gewinnung des Serums für die Versuche schreibt Abderhalden ganz besondere Vorsichtsmaßregeln vor, die darauf hinzielen, Serum zu erhalten, das absolut frei von Formelementen und von gelöstem Hämoglobin ist. Abwesenheit von Formelementen ist ja sehr leicht zu erzielen; Serum vollkommen hämoglobinfrei zu erhalten ist nicht immer leicht möglich, schon allein wegen der häufigen Anwesenheit von Autolysinen, die besonders bei Carcinomatösen eine einwandfrei hämoglobinfreie Serumgewinnung erschweren. Das Blut nüchtern abzunehmen, läßt sich ja leicht durchführen. Man muß das Blut bei ungefähr Zimmertemperatur gerinnen lassen,

weil ja bekanntlich viele Autolysine nur bei sehr niedriger Temperatur gebunden werden, um dann erst beim Verbringen in höhere Temperatur hämolytisch zu wirken. Desgleichen erhält man bei Koagulation im Brutschrank von 37° fast immer leicht hämolytisches Serum; dies Verfahren wird ja bekanntlich oft herangezogen, um eine möglichst hohe Ausbeute von Serum zu erzielen. Den Blutkuchen überhaupt nicht zu berühren, wie Abderhalden ganz neuerdings verlangt, halten wir nicht für erforderlich, da wir aus Erfahrungen an vielen Tausenden von Seren wissen, daß Hämolyse dadurch in keiner Weise bedingt wird, außerdem aber war dies bei den weiten Zentrifugenröhren von beinahe 3 cm Durchmesser niemals nötig, die wir für diese Versuche der erforderlichen großen Blutmengen wegen ausnahmslos benutzten. Der Einfluß des Hämoglobins auf den Versuchsausfall läßt sich nun leicht feststellen; erstens diffundiert gelöstes Hämoglobin nicht durch einwandfrei eiweißundurchlässige Hülsen, es könnte sich also höchstens darum handeln, daß Hämoglobin durch bestimmte Seren abgebaut wird und die dialysablen Abbauprodukte mit Ninhydrin nachweisbar werden[1]). Auch dies könnte — entgegen der Auffassung von Abderhalden — zu Fehldiagnosen nicht führen, da es keine Differenz zwischen der eigentlichen Reaktion: Serum + Organ und der Serumkontrolle herbeiführen kann, da in beiden Hülsen in dieser Beziehung die gleichen Bedingungen herrschen, denn es kommt ja gar nicht auf etwa stattgehabten minimalen Abbau an, der kann auch ohne Hämoglobinanwesenheit im Serum allein vorkommen, sondern es kommt lediglich darauf an, ob in dem Versuch mit Placenta ein stärkerer Abbau stattgefunden hat. Abderhalden kennt den „Abbau im Serum allein" nicht, denn er schreibt (S. 185): „Niemals darf aus dem Umstande, daß der Versuch mit Serum allein eine positive Reaktion gibt, der Schluß gezogen werden, daß während der Dauer des Versuches im Serum Proteine abgebaut worden sind! Die die Reaktion

[1]) Daß es Seren gibt, die koaguliertes Blut abbauen, ist bekannt, daß diese Seren auch koaguliertes Stromata abbauen, haben wir nachgewiesen; ob diese Seren Hämoglobin abbauen und ob dies überhaupt vorkommt, haben wir nicht geprüft, weil es uns für die vorliegende Frage belanglos erschien.

veranlassenden Stoffe waren von Anfang an zugegen.“ Diese Schlußfolgerung von Abderhalden ist nachweislich nicht richtig, worauf auch schon L. Michaelis hingewiesen hat; Abderhalden kann mit seiner Dialysiermethode überhaupt nicht unterscheiden zwischen von vornherein im Serum vorhandenen dialysablen ninhydrinpositiven Stoffen und solchen, die sich erst während der 16stündigen Bebrütung bilden. Jedenfalls kann ein Abbau im Serum allein stattfinden, der an sich allerdings die Spezifität der Reaktion in keiner Weise zu stören brauchte, da es sich ja um eine Differentialmethode handelt.

Dieselben Verhältnisse treffen nun aber auch für hämoglobinhaltige Sera zu und auch nur für die Fälle, in denen ein Abbau von Hämoglobin angenommen werden kann. Höchstens könnte — theoretisch — durch positiven Hämoglobinabbau in beiden Dialysaten (Serum + Organ und Serum allein) eine so starke Ninhydrinreaktion bedingt werden, daß dadurch feine Differenzen, die durch Abbau zugefügter Substrate bedingt sind, übersehen werden können, und man würde bei derartigem Ausfall ja ohne weiteres den ganzen Versuch noch einmal ansetzen; dies kommt aber selbst bei sehr stark hämoglobinhaltigen Seren niemals vor. Wenn bei hämoglobinhaltigem Serum die Serumkontrolle eine negative oder fast negative Ninhydrinreaktion ergibt, sehen wir gar keinen Grund, das Versuchsresultat nicht zählen zu sollen. Man kann sich hiervon durch absichtlichen Zusatz von Hämoglobin — auch von Hämoglobin, das aus dem gleichen Blute stammt wie das Serum (Autolysine) — zu positiv und negativ reagierenden Seren leicht überzeugen, auch solchen, die Blutkörperchen abbauen.

Wir wollen hier nur bemerken, daß Abderhalden die Forderung absolut hämoglobinfreier Seren nur aufstellt, ohne sie näher begründen zu können, immerhin müssen wir betonen, daß wir zu den Versuchen, die wir als einwandfrei nach Abderhaldens Technik angesetzt betrachteten, Seren auch mit der geringsten Hämolyse niemals mitrechneten.

Als Kontrollen setzten wir folgende Versuche in allen Fällen an, wo es irgend angängig war, d. h. wo uns genügend Serum zur Verfügung stand[1]): erstens wurde in vielen Fällen

[1]) Wir sind überzeugt, daß die vielen falschen Berichte über Resultate mit Abderhaldens Reaktion auf ungenügende Kontrolltechnik

jeder Versuch doppelt angesetzt, also Serum + Substrat 2 mal und ebenso die Serumkontrolle. Bei den derartig angesetzten Versuchen wurde jedes Resultat kassiert, bei dem nicht Übereinstimmung zwischen den Doppelbestimmungen herrschte. Wer derartige Doppelbestimmungen nicht häufig gemacht hat, der macht sich von den Schwierigkeiten der Methode gar keinen Begriff, es erscheint uns überhaupt zweifelhaft, ob es möglich ist, in jedem Falle eine absolute Übereinstimmung zu erzielen, und nur in diesem Falle wäre die Abderhaldensche Technik als einwandfrei zu betrachten, ganz abgesehen von den mit dieser Technik erzielten Resultaten.

Jedenfalls zeigte sich bei unseren Versuchen, daß es unmöglich war, Übereinstimmung in Doppelbestimmungen zu erzielen, wenn wir die Hülsen nur alle vier Wochen prüften; wir mußten die Hülsen regelmäßig vor jedem Versuchstage auf ihre Peptondurchlässigkeit eichen[1]).

Der Doppelversuch hat aber nicht nur den Vorteil, Hülsenfehler mit absoluter Sicherheit zu erkennen, sondern es werden dadurch auch Fehler ausgeschaltet, die durch ungleiche Beschaffenheit oder Menge des präparierten Substrates bedingt sein können. Es zeigte sich nun, daß bei der von uns geübten Hülsenprüfung und Substratherstellung Doppelbestimmungen fast regelmäßig tadellos übereinstimmende Resultate ergaben.

Als obligate Kontrolle führten wir außerdem in jeder Untersuchungsreihe eine Hülse mit sehr viel Organ, die einmal gegen destilliertes Wasser, ein zweites Mal gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert wurde. Die Dialysate wurden auf 5 ccm eingeengt und mit 1 ccm Ninhydrin geprüft. Die Organe so zuzubereiten, daß diese Kontrolle erfüllt wird, bietet absolut keine Schwierigkeiten.

---

zurückzuführen sind; immerhin muß berücksichtigt werden, daß zu genügenden Kontrollen enorme Quantitäten von Serum benötigt werden, wer aber einmal mit genügenden Kontrollen arbeitet, wird bald einsehen, wie zahlreiche Fehler er ohnedem übersehen hat und auch übersehen mußte.

[1]) Wir empfehlen diese Doppelbestimmungen, die leider bisher sehr wenig gebraucht wurden, jedem, der sich davon überzeugen will, wie weit er die Methode beherrscht. Bei einer kleinen Anzahl von Graviden richtige positive Resultate erhalten zu haben, schließt nicht aus, daß sehr viele Fehler gemacht wurden.

Fraglich bleibt nur, ob diese Kontrolle die Sicherheit bietet, die sie eigentlich gewähren soll; man versucht damit auszuschließen, daß eine positive Reaktion in dem Versuch: Serum + Substrat durch Summation dialysabler Substanzen aus den beiden gemischten Agenzien entsteht. Von anderer Seite ist dieser Summationsfehler in viel rationellerer Weise dadurch auszuschließen versucht worden, daß man Serum für sich und Organ für sich in je einen Dialysenschlauch gibt und beide Schläuche gemeinsam gegen 20 ccm destilliertes Wasser dialysiert. Anscheinend könnte diese Kontrolle als genügend angesehen werden, um einen Summationseinwand auszuschließen, sie berücksichtigt aber nicht, daß die Lösungsbedingungen für dialysable Stoffe bei der schon oben erwähnten eigentümlichen Beschaffenheit des unvollkommen koagulierten Eiweißes ganz andere sind, wenn man destilliertes Wasser, Kochsalzlösung oder Serum zur Suspension nimmt.

Theoretisch am einwandfreiesten könnte es erscheinen, inaktiviertes Serum zum Vergleich zu nehmen, da hierbei ein fermentativer Abbau des Substrates ausgeschlossen scheinen müßte. Abderhalden schlägt auch diese Kontrolle vor[1]), doch berichtet er leider nicht über Erfahrungen, die er mit dieser Kontrolle gemacht hat. Wir werden gleich beweisen, daß selbst, wenn die Serumfermente durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 60° sicher zerstört würden, eine stärkere Ninhydrinreaktion im Dialysat: Serum + Substrat immer noch nicht beweisend für Substratabbau zu sein braucht, wodurch die Bewertung der erzielten Resultate sehr zweifelhaft wird. Es handelt sich hier prinzipiell um die gleichen Fragen, die den Serologen vom Summationseinwand z. B. bei der Wassermannschen Reaktion bekannt und geläufig sind; bei der Wassermannschen Reaktion hat sich nun dieser Eiwand innerhalb der praktisch in Frage kommenden Grenzen als durchaus nicht stichhaltig erwiesen, er kann auch durch bestimmte Anordnungen in der

[1]) S. 192: „Ergänzungen, die bis jetzt nicht allgemein in Gebrauch genommen worden sind, weil sie nicht absolut notwendig sind. Man kann statt der Kontrolle mit Serum allein eine solche mit Organ + inaktiviertem Serum einschalten. Das Serum wird 30 Minuten auf 60° erhitzt. Diese Art der Kontrolle vermag ein nicht genügend präpariertes Organ anzuzeigen."

Methodik in jedem einzelnen Falle mit Sicherheit ausgeschlossen werden, ebenso müßte für die Fermentreaktion durch entsprechend ausgearbeitete Kontrollen in jedem einzelnen Falle jede mögliche Summation dialysabler ninhydrinpositiver Substanzen ausgeschlossen werden können, auch solcher Substanzen, die ohne spezifische Fermentwirkung entstehen hönnen.

Aus der Vorschrift Abderhaldens ist ersichtlich, daß er die Probe mit inaktiviertem Serum nur als Organkontrolle ansieht, wenn ein Organ an einem Versuchstage mit einem inaktivierten Serum keine Verstärkung der Ninhydrinreaktion gegenüber der Serumkontrolle zeigt, könnte demnach das Organ in dieser Richtung als einwandfrei angesehen werden. Diese Kontrolle haben wir in jeder Versuchsreihe erfüllt. Man kann die einwandfreie Präparierung des Organs auch dadurch beweisen, daß in jeder Versuchsreihe ein vollkommen negatives Resultat vorhanden gewesen sein muß, auch diese Bedingung haben wir an jedem Untersuchungstage erfüllt.

Abderhalden setzt nun aber voraus, daß sich Seren, die durch 30 Minuten langes Erhitzen auf 60° inaktiviert wurden, durchaus gleichmäßig verhalten, dies ist aber keineswegs der Fall.

Interessant sind in dieser Richtung Versuche mit Meerschweinchenserum; dieses Serum — auch wenn es vollkommen hämoglobinfrei ist, was nicht bei jeder Entnahme gelingt — baute bei unseren Versuchen regelmäßig menschliche Placenta ab. Carcinom und die Bakterien, mit denen wir Versuche machten, wurden auch regelmäßig abgebaut.

Etwas Ähnliches hat ja schon Abderhalden bei seinen Versuchen mit Meerschweinchenserum gegenüber Tuberkelbacillen konstatiert. Wieweit dadurch die Frage der Spezifität berührt wird, darauf ist Abderhalden nicht weiter eingegangen, sondern hat nur Meerschweinchenserum als ungeeignet zu derartigen Versuchen bezeichnet.

Daß es sich beim Placentaabbau durch Meerschweinchenserum etwa um schwangere Tiere gehandelt haben könnte, wurde, nachdem zuerst nicht darauf geachtet worden war, dadurch vollkommen ausgeschlossen, daß wir zu diesen Versuchen nur Serum von männlichen Tieren verwendeten; dies ist deshalb notwendig, weil ja nach Angaben von Abderhalden bezüglich des zu verwendenden Substrates keine Artspezifität,

sondern nur eine Organspezifität besteht, so daß es demnach nicht weiter verwundern könnte, wenn Meerschweinchenserum in der Gravidität auch menschliche Placenta abbaut; diese Möglichkeit — wie gesagt — war vollkommen ausgeschlossen. Die Spezifität der Serumfermentreaktion beim Menschen brauchte ja hierdurch nicht in Frage gestellt werden, da das Meerschweinchenserum ja auch in anderer Beziehung eine exzeptionelle Stellung einnimmt, immerhin ist dieser Befund mit der Theorie Abderhaldens über die Entstehung von Serumfermenten nicht in Einklang zu bringen, da hier ein Serum existiert, das wahllos die verschiedensten Substrate „abbaut", ohne daß man annehmen darf, daß diese Erscheinung durch eine frühere Bildung spezifisch eingestellter Serumfermente zustande gekommen sei.

Wir wollen nun gar nicht den entscheidenden Wert auf diese Tatsache des wahllosen Abbaus verschiedenster Substrate legen, wenn man auch zu der Annahme neigen wird, daß ähnliche Verhältnisse unter Umständen doch auch beim Menschen vorkommen werden, sondern es ist methodologisch von großem Interesse, einen Versuch zu machen, die Verhältnisse aufzuklären.

Es zeigte sich nämlich, daß sehr häufig Meerschweinchenserum auch nach 30 Minuten langem Erhitzen auf 60° immer noch Placenta „abbaute", es ergaben sich dabei allerdings ausnahmslos schwächere Reaktionen. Diese Tatsache ist aus dem Grunde so wichtig, weil durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen auf 60° zum mindesten das Komplement des Meerschweinchenserums vollständig zerstört wird, so daß der Einwand, die Erscheinung des „Abbaus" der verschiedensten Substrate werde durch den exzeptionell hohen Komplementgehalt des Meerschweinchenserums erklärt, sicher abgelehnt werden kann. Daß diese Resultate übrigens nicht durch Verwendung schlecht präparierter Placenta erzielt wurden, können wir dadurch beweisen, daß wir am gleichen Versuchstage mit der gleichen Placenta und mit aktiven menschlichen Seren negative Resultate erzielen konnten.

Wenn bei „positivem Abbau" durch Meerschweinchenserum der Komplementgehalt ausgeschlossen werden kann — was die Versuche mit inaktiviertem Serum mit Sicherheit ergeben —,

dann kann man nicht die Erklärung heranziehen, daß die spezifischen Serumfermente einfach gebaut seien und kein Komplement zu ihrer Wirkung bedürfen, denn die spezifischen Serumfermente können ja bei den verwendeten Meerschweinchenseren überhaupt nicht vorhanden sein. Bei der Inaktivierung menschlicher Seren zeigen sich die gleichen Befunde, d. h. nicht ausnahmslos wird ein positiver Abbau durch aktives Serum durch 30 Minuten langes Erhitzen auf 60° unterdrückt. Entweder mußte man nun annehmen, daß es Serumfermente gibt, die teilweise ein $^1/_2$stündiges Erhitzen auf 60° überstehen, dies ist an sich wenig wahrscheinlich, oder aber man müßte die Annahme machen, daß der gegen das gleiche Substrat gerichtete Antikörper resp. Serumferment verschiedene Thermostabilität besitzt.

Beim Meerschweinchen liegen nun aber die Verhältnisse insofern anders, als hier keine spezifischen Serumfermente existieren können, die nach $^1/_2$stündigem Erhitzen auf 60° noch überdauern und den Substratabbau besorgen können. Wenn also bei Verwendung von Meerschweinchenserum und Placenta auch nach $^1/_2$stündiger Erhitzung des Serums auf 60° noch eine positive Ninhydrinreaktion auftreten kann, so kann dies nicht durch einen fermentativen Abbau des Substrates bedingt sein, denn das Komplement ist vollständig zerstört und spezifische Serumfermente können nicht vorhanden sein. Wir stehen hier vor einer höchst bedeutsamen und merkwürdigen Tatsache, die wir vorläufig experimentell nicht erklären können, d. h. wir können nicht angeben, wieso bei Ausschluß eines spezifischen fermentativen Abbaus ninhydrinpositive Stoffe in das Dialysat gelangen.

Nun reagiert aber das aktive Serum stets stärker, man könnte also annehmen, daß diese Differenz zwischen den Dialysaten des aktiven und inaktiven Serums + Placenta zum mindestens von fermentativem Substratabbau herrühren müßte, so daß man eventuell als positive Reaktion nicht die Differenz zwischen den beiden Versuchen Serum + Placenta und Serum allein rechnet, sondern die Differenz zwischen den Versuchen aktives Serum + Placenta und inaktives Serum + Placenta, was in gewisser Weise Öller und Stephan tun. Wenn man eine solche Differenz als beweisend für Substratabbau ansehen

wollte, befindet man sich aber vollkommen im Irrtum, wie wir gleich zeigen können.

Falls das — aktive — Serum sich selbst autolysiert, kommt noch ein Plus an dialysablen Stoffen hinzu, die sich bei der Ninhydrinprobe bemerkbar machen und die bei der Kontrolle mit inaktivem Serum nicht mit berücksichtigt werden können. Abderhalden hält nun merkwürdigerweise diese Spontanveränderung des aktiven Serums für ausgeschlossen und begründet das damit, daß ein Serum nach längerer Bebrütung bei 37° denselben Drehungsgrad zeigt; wie oft dies der Fall ist, gibt Abderhalden nicht an, außerdem fehlt aber der entsprechende Beweis für das Verfahren mit Ninhydrin, da hier doch durchaus andere Verhältnisse vorliegen. Nun kann man ja allerdings mit dem Dialysierverfahren allein gar nicht nachweisen, ob eine „Autolyse" des Serums aufgetreten ist, da die dialysablen Stoffe bestimmt werden und dies erst nach 16 Stunden möglich ist, wo also die vorher vorhandenen ninhydrinpositiven dialysablen Stoffe sich zu den eventuell durch „Autolyse" entstandenen summieren und letztere nicht nachgewiesen werden können. Den Nachweis kann man nun auf zweierlei Weise führen: entweder wir bestimmen den Reststickstoff nach der Preglschen Mikromethode unter Enteiweißung mittels Kochen mit Trichloressigsäure von frischem Meerschweinchenserum und nach 16stündigem Aufenthalt im Brutschranke bei 37° unter Toluol[1]).

[1]) Die Stickstoffbestimmungsmethode ist beschrieben in Abderhalden: Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden 5, 2, 1307; Fritz Pregl: Die quantitative Mikroelementaranalyse organischer Substanzen. Das Prinzip der Methode beruht hauptsächlich auf einer sehr exakt dosierbaren Abmessung des zu veraschenden — flüssigen — Untersuchungsmaterials. Verascht wird in einem ganz kleinen Kölbchen aus Jenaer Glas, aus dem nach beendeter Verbrennung auch gleichzeitig die Destillation des gebildeten Ammoniaks vorgenommen wird. Zur Destillation hat Pregl einen besonderen Destillieraufsatz angegeben, destilliert wird mit Wasserdampf. Die ganze Destilliereinrichtung muß aus Jenaer Glas bestehen, das vor Gebrauch eventuell stundenlang ausgedämpft werden muß, weil die aus dem Glase abgegebenen Alkalimengen ganz empfindliche Fehler verursachen würden. Vorgelegt wird $^{n}/_{70}$-Salzsäure und mit $^{n}/_{70}$-Natronlauge unter Verwendung von Methylrot als Indicator zurücktitriert. Die letzte durch diese Titration meßbare Stickstoffmenge ist nach Pregl 0,002 mg Stickstoff, und dies entspricht nicht

Der Restsickstoff war unter diesen Verhältnissen regelmäßig vermehrt; ob Bakterieneinwirkung eine Rolle dabei gespielt haben kann, werden wir noch weiter unten besprechen, jedenfalls war das Serum unter allen aseptischen Kautelen entnommen worden. Das gleiche Verhalten, nämlich Vermehrung des Reststickstoffs nach 16stündiger Bebrütung bei 37° unter Toluol, kann man auch bei menschlichen Seren beobachten, es ist also sicher diese Tatsache nicht nur auf Meerschweinchenserum beschränkt.

Eine zweite Möglichkeit, Spontanveränderung des Serums zu beweisen, und zwar unter Heranziehung des Dialysierverfahrens, besteht darin, daß man das gleiche Serum aktiv und inaktiv in größeren Mengen dialysiert, das Dialysat mit so großen Mengen Ninhydrin kocht, daß die Probe mit inaktivem Serum eine leicht violette Färbung erkennen läßt, das aktive Serum ergibt dann im Dialysat sehr häufig eine stärkere Ninhydrinreaktion. Diese Beobachtungen sind durch Doppelbestimmungen sichergestellt. Auf die Frage, ob man diese „Spontanveränderungen" von Serum als „Autolyse" bezeichnen kann, kommen wir noch weiter unten zu sprechen.

Wenden wir nun die eben erhobenen Befunde auf die oben gegebene Tatsache an, daß Meerschweinchenserum eine nach den Vorschriften Abderhaldens einwandfrei positive Serumfermentreaktion gegenüber Placenta (Carcinom, Bakterien usw.) ergibt, so bleibt die Deutung des fermentativen Substratabbaus auch noch bestehen. Selbst wenn man die Tatsache berücksichtigt, daß das Dialysat von: inaktives Serum + Placenta zwar eine positive, aber doch regelmäßig schwächere Ninhydrinreaktion ergibt als der Versuch: aktives Serum + Placenta. Nimmt man nun aber noch die weitere — sicher bewiesene — Tatsache des „Selbstabbaus" aktiven Meerschweinchenserums hinzu, so bleibt es höchst zweifelhaft, ob die starke

---

nur den theoretisch ausgerechneten Verhältnissen, sondern läßt sich auch praktisch durchführen. Wir wollen nicht weiter auf Details dieser Methode eingehen, jedenfalls haben wir sehr zahlreiche Reststickstoffbestimmungen an Serum mit dieser Methode unter Verwendung von 1 ccm Serum gemacht, wir verfügen über zahlreiche Resultate, wo die größte Differenz unter fünf bis sechs Parallelbestimmungen noch nicht $^1/_{100}$ mg N betrug.

positive Reaktion im eigentlichen Versuch, dessen Resultat man dann als absolut unspezifisch bezeichnen mußte, überhaupt mit einem fermentativen Substratabbau etwas zu tun hat oder lediglich einer Summation gänzlich unspezifischer Komponenten zuzuschreiben ist.

Diese sicher festgestellten Tatsachen sind für die Beurteilung des Ausfalls der Abderhaldenschen Reaktion von größter Bedeutung; Versuche, die hier geschilderten Fehlermöglichkeiten auszumerzen, wollen wir weiter unten besprechen.

Bei der Inaktivierung menschlicher Seren für die Zwecke der Serumfermentuntersuchung kamen wir zu nicht eindeutigen Resultaten; es gibt Seren, die unspezifisch „abbauen", wo die Ninhydrinreaktion auch mit inaktivem Serum positiv ausfällt, wenn auch regelmäßig schwächer als im Hauptversuch. Positiv reagierende Seren von Graviden können sich aber auch ähnlich verhalten, so daß eine Unterscheidung spezifischen und unspezifischen Abbaues, wie wir sie auf diesem Wege versuchen wollten, nicht gelingt. Aber selbst in den Fällen, wo bei inaktivem Serum auch eine positive Ninhydrinreaktion erzielt wird, ist der stärkere Ausfall der Ninhydrinreaktion im Hauptversuche nicht absolut beweisend für einen Substratabbau, da ja das Serum allein „sich abbauen" kann.

Nach den merkwürdigen Ergebnissen der Versuche mit inaktivierten Seren scheint es uns demnach erwiesen, daß die Organkontrolle mit destilliertem Wasser nicht genügt, da hier die Verhältnisse durchaus anders liegen, als wenn das Organ in Serum dialysiert wird. Als genügende Kontrolle in dieser Richtung muß aber die Kontrolle angesehen werden, wenn in jeder Versuchsreihe ein sicher negativer Versuch mit Placenta mitläuft, dann müssen Fehler durch peptonhaltiges Substrat mit Sicherheit ausgeschlossen sein.

Auf die Untersuchungen von F. Plaut und U. Friedemann, die die Beeinflussung aktiver Sera durch Suspensionen von anorganischen Körpern demonstrieren, wollen wir hier, wo es sich um die eventuelle Beeinflussung gekochter Organe durch inaktivierte Sera — wo man also eine Serumfermentwirkung für ausgeschlossen halten müßte — handelt, nicht näher eingehen. Eine wie große Bedeutung diesem Moment beizulegen ist, läßt sich gar nicht abschätzen, im Prinzip laufen

diese Befunde in ihrem Einfluß auf den Ausfall der Abderhaldenschen Reaktion parallel den Befunden von Selbstverdauung von aktiven Seren.

Betreffs der Differenz im Ausfall der Ninhydrinreaktion in den beiden Versuchen: Serum + Substrat und Serum allein, muß jedenfalls festgestellt werden, daß Serum, sei es durch seine OH-Ionenkonzentration, sei es durch seine kolloidale Beschaffenheit oder wodurch auch immer in gewissen Fällen — keineswegs immer, denn sonst gäbe es ja überhaupt keine negativen Reaktionen — auch ohne den Einfluß eines spezifischen Fermentes die Placenta so verändern kann (oder umgekehrt die Placenta das Serum), daß im Dialysat die Ninhydrinreaktion positiv werden kann. Dies geht unseres Erachtens aus den Versuchen mit inaktivierten Seren hervor, man müßte denn annehmen, daß es Serumfermente gibt, die durch 1/2stündiges Erhitzen auf 60° nicht zerstört werden, was schon an sich und auch durch das unregelmäßige Verhalten der Erscheinung sehr unwahrscheinlich ist.

Die Kontrolle: inaktives Serum + Organ kann demnach allein nicht genügen, um die Vortäuschung eines Substratabbaues gänzlich auszuschalten, bei dieser Möglichkeit müssen 3 Faktoren berücksichtigt werden, die durch Summation einen Abbau vortäuschen können: erstens die dialysablen ninhydrinpositiven Stoffe (*a*) des zu untersuchenden Serums; diese Stoffe treten bei allen drei der in dem (S. 236) beigefügten Schema gegebenen Versuchsanordnungen durch die Hülse und beeinflussen die Ninhydrinreaktion, auch dann, wenn die Ninhydrinreaktion im Versuch Serum allein gänzlich negativ ausfällt, was ja die Abwesenheit derartiger Stoffe keineswegs beweist.

Zweitens müssen die Stoffe berücksichtigt werden, die auch bei Verwendung inaktiver menschlicher Seren durch die Membran hindurchtreten können, seien dies nun Stoffe, die durch Serum an sich, nicht aber durch destilliertes Wasser aus der Placenta gelöst werden können (*b*), oder gar noch Stoffe, die durch Organemulsion nur aus dem aktiven Serum erzeugt werden nach F. Plaut (b_1); die Stoffe *b* kommen in Versuch 1 und 3 in Frage, falls man annimmt, daß die Serumfermente durch 1/2stündiges Erhitzen auf 60° zerstört sein müßten, b_1 kommt nur für den Versuch 1 in Betracht. Drittens müssen bei einer möglichen Summation noch die Stoffe berücksichtigt

werden, die durch „Autolyse des aktiven Serums“ als dialysable Produkte auftreten können. Über die Möglichkeit dieses Vorganges kann kein Zweifel bestehen, ebenso auch darüber, daß dieser Prozeß durch das Dialysierverfahren in der üblichen Anordnung nicht aufgedeckt werden kann; diese Stoffe (*c*) sind nur in Versuch 1 und 2 in Rechnung zu setzen. Viertens kann, da das Dialysierverfahren nicht obligat eine bakteriologische Kontrolle zwecks Prüfung auf steriles Arbeiten vorschreibt, nicht ausgeschlossen werden, daß trotz sorgfältigster Serumgewinnung und trotz Toluolüberschichtung von den Keimen, die fraglos stets in das Serum in die Dialysierhülse gelangen, bei 16stündiger Bebrütung in diesem ausgezeichneten Kulturmedium eine Vermehrung von Keimen eintritt, die ebenfalls zu dialysablen ninhydrinpositiven Stoffen führt; dies ist besonders dann zu berücksichtigen, wenn die Dialysierhülse — wie üblich — nach Beschickung mit dem Finger unter Leitungswasser gesäubert wird. Daß in Serum, das in der Höhe wie sie im gewöhnlichen Dialysierschlauch steht, mit Toluol vorsichtig überschichtet ist — nicht durchgemischt, denn so entspricht es den Versuchsbedingungen — eingeimpfte Bakterien sich in 16 Stunden bei 37° vermehren können, davon kann man sich leicht überzeugen.

Man könnte nun auf den ersten Blick annehmen, daß wenigstens dieser Summationsfaktor in allen drei Versuchsanordnungen dem obigen Schema gleich zu setzen sei, aber selbst dies ist keineswegs der Fall, denn im Versuch 3 mit inaktiviertem Serum sind eventuell die meisten Bakterien durch das $^{1}/_{2}$stündige Erhitzen auf 60° abgetötet, wobei man also von den dialysablen Stoffen (*d*), die durch bakterielle Verunreinigung die Ninhydrinreaktion im Dialysat in Versuch 1 und 2 beeinflussen können, bei Versuch 3 noch ein unbekanntes Quantum *x* abziehen muß.

Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3
Serum + Organ	Serum allein	Inaktives Serum + Organ
a	*a*	*a*
b		*b*
(b_1?)		
c	*c*	
d	*d*	($d-x$)

Man sieht aus diesen Ausführungen, daß in den drei Versuchen ohne die Annahme eines spezifischen Abbaues Stoffe auftreten können, die den Versuch immer nach der Richtung hin beeinflussen, im Versuch 1 einen Überschuß von Substanzen, die eine positive Ninhydrinreaktion bedingen können, gegenüber den anderen Versuchen zu produzieren, so daß in Versuch 1 die Ninhydrinreaktion deutlich stärker werden kann als in Versuch 2 oder 3, ohne daß ein spezifischer fermentativer Abbau stattgefunden zu haben braucht.

Wir glaubten zuerst, ein sicheres Kriterium für stattgehabten Abbau in Versuch 1 darin finden zu können, wenn in Versuch 1 eine stärkere Ninhydrinreaktion aufträte als in einem Gemisch von je 10 ccm Dialysat Versuch 2 und 3, das auf die Hälfte, also auf 10 ccm eingedampft wäre, doch zeigt die oben ausgeführte Berechnung, daß dies auch nicht zu einwandfreien Resultaten führen kann, da in $\frac{2+3}{2}$ ein *a* zu viel ist, und selbst wenn Versuch 1 stärker ist als $\frac{2+3}{2}$, dann müßte in diesem Falle immer noch der Plautsche Einwand widerlegt werden. Es gibt überall Differenzen in den drei Versuchen, die einen Vergleich bis auf Bewertung der minimalsten Differenz im Ausfall der Ninhydrinreaktion bei Versuch 1 und 2 mit Sicherheit nicht zulassen, in Versuch 3 werden zwar einige, aber auch nicht sämtliche Summationsfehler ausgeschlossen, so daß auch ein Plus in Versuch 1 gegenüber Versuch 3 noch immer nicht beweisend ist für Abbau; die gänzlich andere OH-Ionenkonzentration, die in Versuch 3 durch das $^1/_2$stündige Erhitzen auf 60° entsteht, ist dann in ihrer Wirkung noch gar nicht einmal berücksichtigt, wie überhaupt die wahre Reaktion, d. h. die Konzentration der Wasserstoff- und Hydroxylionen, bei der Abderhaldenschen Reaktion als einem Fermentprozeß viel mehr Beachtung verdiente. Wenn man an eine Spezifität der verschiedenen Fermente glaubt, wäre es sehr dankbar, festzustellen, ob für verschiedene dieser „Fermente“ ein verschiedenes Optimum der H-Ionenkonzentration zu finden ist, wodurch eventuell weitere Differenzierungen ermöglicht würden. Wir hatten Versuche in dieser Richtung angestellt, haben sie aber aus Gründen, die später

ohne weiteres ersichtlich sein werden, bald wieder aufgeben müssen.

Daß Summationsfehler, wie sie eben geschildert wurden, vorkommen können und müssen, scheint uns nach unseren Versuchen sichergestellt; wie oft sie sich einstellen können, darüber läßt sich nichts sagen, da eine Analyse der einzelnen geschilderten Vorgänge, die sich gegenseitig überdecken, mit dem Dialysierverfahren theoretisch unmöglich ist.

Wir haben nun versucht, diese Vorgänge voneinander getrennt quantitativ darzustellen, um ev. auf diesem Wege zu einem Verfahren zu gelangen, das Summationsfehler auszuschließen gestattet und außerdem bei Feststellung quantitativer Differenzen bei spezifischem und unspezifischem „Abbau" ev. immer noch eine praktisch verwendbare Diagnostik ermöglicht. Wie wir gleich vorwegnehmen wollen, sind diese Versuche in beiderlei Richtung gescheitert. Die Summationsfehler konnten wir mit diesem Verfahren deshalb nicht ausschließen, weil es uns unmöglich war, die Versuchsbedingungen so zu gestalten, daß man mit genau vergleichbaren Größen arbeitet.

Wir beschäftigten uns mit diesen Versuchen seit über einem Jahr, und es erschien uns als geeignetes Verfahren die Methode der Reststickstoffbestimmung, wobei der Stickstoff nach der bekannten Mikromethode von Pregl bestimmt wurde. Man kann mit dieser Methode eine Genauigkeit von $\pm$ 0,01 mg N nach einiger Übung erzielen. Für die quantitative Bestimmung von Differenzen dialysabler Stoffe bei Anwendung des Dialysierverfahrens würde vielleicht die Bestimmung der organischen Substanzen mittels Kaliumpermanganat genügen, die natürlich weit einfacher ist als der Mikro-Kjeldahl. Die Vorzüge der Reststickstoffbestimmung liegen aber gerade darin, daß man den Hauptfehler des Dialysierverfahrens, nämlich den Hülsenfehler, ausschalten kann; zweitens kommt für diese Bestimmungen gegenüber dem dialysablen Stickstoff ein Plus zugute, nämlich die höheren Albumosen, die nicht dialysieren und deshalb beim Dialysierverfahren nicht mitbestimmt werden. Außerdem kann man, wenigstens für theoretische Untersuchungen, die Menge des nicht koagulablen Stickstoffs durch Vermehrung des abbauenden Serums beliebig steigern. Am wichtigsten für diese Frage ist eine absolut sichere Methode der Enteiweißung, die

einwandfrei alle genuinen Eiweißkörper entfernt bei möglichst geringem Verlust an höheren Eiweißspaltprodukten. Wie vorauszusehen war, gibt es keine Methode, die diese Anforderungen restlos erfüllt, d. h. eine quantitative Trennung zwischen genuinen Eiweißkörpern und Albumosen gelang uns mit keiner der gebräuchlichen Methoden. Wir versuchten die Enteiweißung mit Essigsäure, Natriumphosphat und Kochsalz, Kochen + Trichloressigsäure, und die Enteiweißungsmethoden mit kolloidalem Eisen und Mastix; die Enteiweißung mit Alkohol ist für den vorliegenden Zweck nicht zu gebrauchen, weil dabei die Albumosen verloren werden. Bei der Enteiweißung durch Kochen unter Kochsalzzusatz mit Essigsäure und Natriumphosphat macht sich vor allen Dingen der Übelstand bemerkbar, daß das Eiweißkoagulum sich so schwer abfiltrieren läßt; man muß 24 Stunden warten, und selbst dann ist das Filtrat häufig nicht absolut frei von Eiweiß. Vermehrt man den Zusatz von Kochsalz, so besteht wieder die Gefahr, Albumosen in größerer Menge zu verlieren; man bekommt sofort ein klares, eiweißfreies Filtrat, wenn man ein Quantum frisch gefälltes Bariumsulfat in Suspension zu der Lösung hinzusetzt und zentrifugiert und dann durch Hartfilter filtriert; die Methode ist zwar ziemlich umständlich, erlaubt jedoch gut quantitatives Arbeiten. Ob durch den Zusatz von Bariumsulfat noch Albumosen durch Adsorption mitgefällt werden, konnten wir nicht ohne weiteres einwandfrei entscheiden.

Eine sehr bequeme und sichere Methode zur Enteiweißung von Serum ist Kochen mit nachträglichem Zusatz von Trichloressigsäure; diese Methode ist unseres Erachtens auch für klinische Zwecke der Reststickstoffbestimmung in kleinen Mengen sehr empfehlenswert. Zu bemerken ist hierbei, daß ein Überschuß von Trichloressigsäure in recht weiten Grenzen unschädlich ist, da er nicht zur Bildung von Acidalbumin führt. Trichloressigsäure soll, wenn die Filtration noch heiß erfolgt, überhaupt keine Albumosen mit ausfällen (Mestrezat), doch ist auch dies nur mit Vorbehalt richtig, da kleine Mengen, wie sie beim Serumfermentnachweis eine große Rolle spielen können, mitgerissen werden; es kommt hierbei sehr auf den Gehalt an Neutralsalzen an, da solche die Koagulation der Albumosen selbst in schwacher Konzentration sehr befördern. Bei der

Koagulation von Serum durch Kochen mit Trichloressigsäure verdünnt man am besten das Serum mit destilliertem Wasser auf $^1/_{10}$ und gibt auf je 1 ccm der Verdünnung nach Aufkochen 1 Tropfen konzentrierte Trichloressigsäure zu, worauf man heiß durch Hartfilter filtriert; man erhält sofort ein leicht filtrierendes klares, eiweißfreies Filtrat, das ev. erst noch mit Spiegler, Sulfosalicylsäure usw. auf Abwesenheit von Eiweißkörpern untersucht wird; auf einen Punkt, der hierbei wesentlich in Frage kommt, werden wir weiter unten noch hinweisen. Störend für ev. nachherige Anstellung der Ninhydrinreaktion ist nur die Veränderung der Reaktion, da die Ninhydrinreaktion nur bei neutraler Reaktion zuverlässig ist; man muß dann neutralisieren unter peinlichster Vermeidung, eine auch noch so schwache alkalische Reaktion zu erzielen, weil dadurch eine positive Ninhydrinreaktion verdeckt werden kann. Diese Methode ist daher mehr geeignet für nachherige Reststickstoffbestimmung; für Anstellung der Ninhydrinreaktion sind die Enteiweißungen mit kolloidalem Eisen und Mastix empfehlenswerter, da sie ohne jede Veränderung der Reaktion arbeiten, doch kommt es leichter zu Versagern als bei der Methode mit Trichloressigsäure. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Methoden liegt darin, daß bei der Enteiweißung mit kolloidalem Eisen und Mastix noch mehr höhere Albumosen ausgefällt werden; dieselben können zwar fast quantitativ bei der Mastixmethode wiedergewonnen werden, doch ist dies Verfahren so umständlich, daß es für die vorliegenden Zwecke kaum in Frage kommt. Stellt man nun mit der enteiweißten Lösung die Ninhydrinreaktion an, so fällt der Verlust höherer Albumosen kaum ins Gewicht, da für diese Eiweißspaltprodukte die Ninhydrinreaktion sehr unempfindlich ist, Peptone und Aminosäuren gehen quantitativ ins Filtrat.

Wir zogen die Enteiweißung mit Trichloressigsäure aus dem Grunde vor, weil sie mit normalem Serum unter den oben angegebenen Bedingungen so ausnahmslos ein eiweißfreies Filtrat ergibt, daß man sich in jedem Falle darauf verlassen kann. Da nun alle Eiweißreagenzien auch gleichzeitig sehr feine Reagenzien für Albumosen sind, so wäre es unter gewissen Versuchsbedingungen denkbar, daß ein einwandfrei ent eiweißtes Serum, das im Kontakt war mit einem Substrat, das

es abzubauen imstande ist, eine Reaktion mit Eiweißreagenzien gibt, die gar nicht auf genuines Eiweiß, sondern auf die durch stattgehabten Abbau entstandenen Albumosen zurückzuführen wäre. In den angegebenen Verdünnungen findet man zwar im Filtrat von Seren mit positivem Abbau niemals mit den gewöhnlichen Eiweißreagenzien (Asaprol ausgenommen) eine Reaktion, die auf Albumosen zurückzuführen wäre, immerhin zogen wir auch aus diesem Grunde — absolut sichere Enteiweißung ohne Herumprobieren — die Enteiweißung mit Trichloressigsäure allen anderen von uns versuchten Enteiweißungsmethoden vor.

L. Michaelis, der ebenfalls seine Eisenmethode zur Enteiweißung an Stelle der Dialysierhülsen verwandte, stellte einen vollkommenen Parallelismus zwischen dem Ausfall der Ninhydrinreaktion im Dialysat und der enteiweißten Lösung fest. Wir konnten bei gleicher Versuchsanordnung einen absoluten Parallelismus nicht finden, manchmal war die Ninhydrinreaktion in der enteiweißten Lösung stärker, manchmal schwächer, doch handelte es sich meist um minimale Differenzen.

Immerhin sind diese ganzen Versuche deshalb für die vorliegende Frage von so großer Bedeutung, weil sie beweisen, daß eine Feststellung von „Serumfermentwirkungen“ auf mindestens ebenso sichere Weise wie mit dem Dialysierverfahren auch mit Enteiweißungsmethoden zu erzielen ist. Die Enteiweißungsmethoden arbeiten sicherer und einfacher als die Dialysierschläuche, und es ist selbst für einen Ungeübten leichter, sich auf diese Technik einzuarbeiten, als den unendlich zahlreichen Fehlern zu entgehen, die bei Anwendung der Dialysierschläche möglich sind.

Einem jüngst gemachten Vorschlage Abderhaldens glauben wir keine große Zukunft versprechen zu dürfen, die Dialyse durch Bechholdsche Ultrafiltration zu ersetzen. Wir machten schon vor einem Jahre, von derselben Idee ausgehend, Versuche in dieser Richtung, mußten uns aber sehr bald davon überzeugen, daß für quantitatives Arbeiten der Bechholdsche Apparat bis jetzt noch weit unzuverlässiger arbeitet als die Dialysierhülsen. Die Dichtungen versagen viel leichter als die immerhin fast immer eiweißundurchlässigen Dialysierhülsen, außerdem würden, selbst wenn man die Typen des Bechhold-

schen Apparates noch wesentlich verkleinerte, immer noch weit größere Mengen Serum erforderlich sein als beim Dialysierverfahren, und schon bei diesem Verfahren macht es sich für jeden, der mit Kontrollen zu arbeiten gewohnt ist, unangenehm bemerkbar, daß man durch die hierbei erforderlichen Quanten fast immer an der Anstellung genügender und zum Teil fundamentaler Kontrollen gehindert ist. Den Enteiweißungsmethoden gegenüber kann mit den jetzigen Hilfsmitteln die Ultrafiltration für den Nachweis von Serumfermenten keinerlei Verbesserung bringen.

Ein wesentlicher Vorteil der Enteiweißungsmethoden könnte aber darin gesehen werden, daß man imstande wäre, mit weit geringeren Quanten Serum auszukommen, man müßte nur eine passende Verdünnung und adäquate höhere Ninhydrinmenge ausprobieren, um auch bei geringeren Mengen „positiven Abbau" nachweisen zu können.

Auf zwei mögliche Differenzen im Ausfall der Reaktion bei Verwendung des Dialysier- oder Enteiweißungsverfahrens wollen wir hier noch kurz hinweisen, da sie bis jetzt der Beobachtung entgangen sind und eine Erklärung dafür bieten, warum mit beiden Methoden nicht immer übereinstimmende Resultate zu erzielen sind. Es ist erstens theoretisch möglich, daß ohne Dialyse andere Resultate erzielt werden, weil die Eiweißspaltprodukte nicht durch Dialyse entfernt werden und deshalb den Fermentprozeß hindernd beeinflussen können. Ohne weiteres läßt sich zwar diese Möglichkeit nicht von der Hand weisen, doch bei der außerordentlich geringen Menge der gebildeten Spaltprodukte muß dies als sehr unwahrscheinlich bezeichnet werden.

Eine zweite Differenz, die viel mehr ins Gewicht fällt, ist der Umstand, daß beim Dialysierverfahren ja gegen destilliertes Wasser und nicht physiologische Kochsalzlösung dialysiert wird, so daß innerhalb bestimmter Zeit die Globuline wesentlich verändert werden, was bei der Methode des Enteiweißungsverfahrens wegfällt. Was für Möglichkeiten durch diese wesentlich differente Versuchsanordnung geschaffen werden, haben wir schon weiter oben auseinandergesetzt. Es ist nach all diesem nicht zulässig, das Dialysierverfahren ohne weiteres mit dem Enteiweißungsverfahren vergleichen zu wollen, die Resultate können

auch bei theoretisch noch so einwandfreier Verwendung beider Methoden nicht vollkommen übereinstimmen; immerhin müssen wir, um irrtümlichen Auffassungen vorzubeugen, betonen, daß wir trotz der geschilderten Differenzen das Enteiweißungsverfahren für einwandfreier halten als das Dialysierverfahren.

Die eben besprochene Methode bezog sich darauf, ein Kontrollverfahren zu schaffen, das die Benutzung der Hülsen und die unendlich vielen, damit verbundenen Fehlermöglichkeiten ausschließt; es erschien uns aber ebenso wichtig — und wir haben diesem Punkte besondere Aufmerksamkeit zugewendet —, zur Kontrolle noch eine andere empfindliche Reaktion neben der Ninhydrinreaktion zu finden, die eventuell auch quantitative Bestimmungen zuließe, sei es nun, daß man das Dialysier- oder eins der Enteiweißungsverfahren verwendete.

Abderhalden empfiehlt ja nun zu diesem Zwecke neben der Ninhydrin- die Biuretreaktion, doch war es uns vollkommen unmöglich, mit der letzteren auch nur annähernd ähnliche Resultate zu erzielen. Dies liegt unseres Erachtens daran, daß die Biuretreaktion — abgesehen von ihrer geringen Empfindlichkeit Peptonen gegenüber — auch theoretisch in dem Falle für den Nachweis von Serumfermenten nicht zulässig ist, falls der Abbau über die Peptone hinaus bis zu Aminosäuren vorschreitet. Es ist nun unmöglich, die bei der Dialyse oder bei dem Enteiweißungsverfahren erhaltenen Produkte in ihre verschiedenen Komponenten zu zerlegen; wir gingen deshalb so vor, daß wir durch Vergleich verschiedener hochempfindlicher Reagenzien wahrscheinlich zu machen versuchten, daß durch „Serumfermente" Abbauprodukte entstehen, die unter der Peptongrenze stehen und infolgedessen mit der Biuretreaktion nicht nachgewiesen werden können, womit demnach die Unbrauchbarkeit der Biuretreaktion für diese Zwecke auch theoretisch erwiesen wäre.

Es zeigt sich nun, daß selbst so feine Peptonreagenzien wie das Asaprol einen positiven Ausfall bei positiver Ninhydrinreaktion im Dialysat nicht anzuzeigen vermochten; wir machten außerdem auch noch mit anderen Reagenzien ausgedehnte Versuche. Für den Peptonnachweis ist nun Asaprol weit empfindlicher als die Biuretreaktion und dem Ninhydrin fast gleich; für das Enteiweißungsverfahren kommt noch hinzu, daß das

Asaprol für Albumosen weit empfindlicher ist als Ninhydrin, für Aminosäuren dagegen versagt es. Aus unseren Erfahrungen mit Asaprol und anderen empfindlichen Reagenzien möchten wir den Schluß ziehen, daß beim Zustandekommen einer positiven Ninhydrinreaktion durch Substratabbau abiurete Spaltprodukte (d. h. die mit der Biuretreaktion nicht mehr nachweisbar sind), für die gerade die Ninhydrinreaktion so empfindlich ist, eine — wenn auch vielleicht nicht konstante — Rolle spielen; deshalb versagen selbst Peptonreagenzien, die viel feiner sind als die Biuretreaktion.

Eine qualitative Reaktion — sei es Ausfällungs-, sei es Farbreaktion — zum Nachweis von fermentativem Substratabbau, die mit der Ninhydrinreaktion konkurrieren könnte, konnten wir nicht finden.

Nun gibt es eine Methode, die ebenso gut höhere Albumosen wie Aminosäuren anzeigt, auf deren Differenzierung es ja bei der vorliegenden Frage nicht ankommt, das ist die Bestimmung des Reststickstoffs. Man kann mit der Preglschen Mikromethode Differenzen zwischen positiven und negativen Reaktionen aufdecken.

Die Vorteile dieses Verfahrens schienen uns anfangs darin zu liegen, daß man erstens die bei Besprechung der Summationsfehler erwähnten Faktoren einzeln quantitativ bestimmen könnte — was mit dem Dialysierverfahren unmöglich ist — und dadurch ihre Elimination ermöglichte; zweitens hofften wir, quantitative Differenzen zwischen dem Abbau bei spezifischen und unspezifischen Reaktionen aufdecken zu können, worauf ja auch die spektrophotometrischen Untersuchungen von Herzfeld hindeuten.

Es zeigte sich nun aber bei unseren ausgedehnten Erfahrungen mit dem Dialysierverfahren und der Ninhydrinreaktion, daß eine quantitative Differenzierung spezifischen und unspezifischen Abbaus nicht möglich ist, da auch Seren von Carcinomatösen und Salpingitiden oft ebenso starke Ninhydrinreaktion ergeben wie vorgeschrittene Graviditäten. Daneben zeigte sich, daß auch mit diesem Verfahren eine Ausschaltung sämtlicher Summationsfehler unmöglich ist, so daß wir mit dieser Methode keine großen Versuchsreihen anstellten. Immerhin ist es erwiesen, daß man mit dieser Methode, besonders

bei Anwendung größerer Serummengen, Resultate erzielen kann, die mit der Ninhydrinreaktion einen Vergleich aushalten.

Schon eine theoretische Berechnung kann zeigen, daß wir auch mit diesem Verfahren Summationsfehler bis jetzt nicht ausschalten können; wir beziehen uns hier mit unseren Bezeichnungen auf das Schema S. 236, wo wir die Summationsfehler besprachen.

Zuerst bestimmt man von dem zu untersuchenden Serum in Doppelbestimmung den Reststickstoff; hierzu genügt vollkommen ein Quantum von annähernd 1 ccm. Dieser Wert ist parallel (nicht gleich) zu setzen dem Werte *a* (S. 236) der dialysablen ninhydrinpositiven Substanzen im frischen, unveränderten Serum. Nach 16stündigem Verweilen des Serums bei 37° bestimmt man wieder den Reststickstoff, der eventuell vermehrt gefunden werden kann; dieser Wert entspricht dem Werte *c* gleich dialysable Substanzen + Autolyse des Serums inklusive eventueller Bakterienwirkung. Außerdem wird der Reststickstoff von (aktivem Serum + Placenta) und (inaktivem Serum + Placenta) bestimmt. Das Serum darf hierbei nicht mit der Placenta aufgekocht werden, sondern die Placenta wird erst scharf abzentrifugiert, mit Wasser ausgewaschen und dieses Spülwasser, mit dem Rest vereinigt, enteiweißt. Man bestimmt außerdem den Reststickstoff des inaktiven Serums nach 16 Stunden; aus der Differenz gegenüber dem aktiven Serum bekommt man den „Autolysenwert". Schon hier ergibt sich die Unmöglichkeit, verminderte Bakterieneinwirkung und veränderte OH-Ionenkonzentration in Rechnung zu ziehen; der Wert *d* läßt sich ebenfalls nicht bestimmen. Man könnte nun von dem Wert, den aktives Serum + Placenta ergab, den Reststickstoff des aktiven Serums nach 16stündiger Bebrütung abziehen und vom Reststickstoff: inaktives Serum + Placenta den Reststickstoff: inaktives Serum nach 16 Stunden; eine etwaige Differenz könnte man als den Stickstoffwert betrachten, der durch „Serumfermentwirkung" entstanden ist, wenn sich nicht mehrere Faktoren der Bestimmung entzögen.

Diese Untersuchungen können natürlich praktisch überhaupt keine Bedeutung gewinnen; uns lag nur daran, zu zeigen, daß es selbst mit einem genauen quantitativen Verfahren unmöglich ist, Summationsfehler mit Sicherheit auszuschließen.

Zum Schluß müssen wir noch auf die Technik der Anstellung der Ninhydrinreaktion näher eingehen, da es den meisten Untersuchern vollkommen entgangen zu sein scheint, daß auch hier bei genauester Innehaltung der Abderhaldenschen Vorschriften Differenzen bei Doppelbestimmungen vorkommen können, die gegebenenfalls einen positiven Abbau vortäuschen können.

Viel wichtiger als die gleichmäßige Einengung durch das Kochen, die leicht zu erzielen ist, scheinen uns zwei Punkte: erstens die Art der bei der Anstellung der Ninhydrinreaktion zum Kochen benutzten Reagensgläser und zweitens die genaue Abmessung der 0,2 ccm 1 $^{0}/_{0}$iger Ninhydrinlösung.

Nachdem wir uns durch Doppelbestimmungen davon überzeugt hatten, daß mit gewöhnlichen Reagensgläsern und einwandfreiem Kochen nicht immer eine absolute Übereinstimmung im Ausfall der Ninhydrinreaktion zu erzielen war, benutzten wir nur noch Reagensgläser aus Jenaer Glas, die beim Kochen kein Alkali abgeben und dadurch nicht die Ninhydrinreaktion beeinflussen können, die gegen Veränderungen der Reaktion sehr empfindlich ist; die gleichen Erfahrungen wurden übrigens inzwischen schon von Flatow beschrieben. Die Verwendung von Reagensgläsern aus Jenaer Glas war ursprünglich aus dem Grunde geschehen, weil derartige Gläser beim Kochen fast nie platzen. Bis jetzt ist niemals der Übelstand betont worden, daß manchmal 5 bis 10 $^{0}/_{0}$ der gewöhnlichen Reagensgläser beim Anstellen der Ninhydrinreaktion platzen. Wenn dies vorkommt, sind die betreffenden Versuche verloren, da man die 10 ccm Dialysat aus dem geplatzten Röhrchen nicht noch einmal kochen kann und man zur Anstellung eines zweiten Versuches nicht noch einmal 10 ccm zur Verwendung hat, da das Dialysat nur 10 ccm unter Toluol enthält, aus dem man nie 2 mal mit der Pipette 10 ccm entnehmen kann.

Als zweiten sehr empfindlichen Übelstand bei Anstellung der Ninhydrinreaktion empfanden wir die Abmessung von 0,2 ccm 1 $^{0}/_{0}$iger Ninhydrinlösung. Es erschien uns weit rationeller, dieselbe Menge Ninhydrin etwa in 1 ccm zuzugeben, da dabei die Abmessungsfehler weit geringer ausfallen, weil nämlich Differenzen um wenige Prozent der Ninhydrinmenge schon einen veränderten Ausfall der Ninhydrinreaktion bedingen können; wir haben natürlich, um Differenzen gegenüber der Abderhalden-

schen Technik zu vermeiden, immer mit 0,2 ccm gearbeitet. Bei Abmessung der nötigen Ninhydrinmenge aus Tropfflaschen können die größten Fehler vorkommen. Ein Fehler wird häufig bei der Abmessung der Ninhydrinlösung begangen, wenn man Pipetten von 1 ccm verwendet, die auf $^{1}/_{100}$ ccm eingeteilt sind, daß man nämlich die 0,2 ccm auslaufen läßt, die der Einteilung 0,8 bis 1,0 ccm entsprechen; dabei bleibt immer ein verschieden großer Teil der Ninhydrinlösung in der Pipette haften, den man auch durch Durchhauchen nicht entfernen kann, was übrigens durchaus fehlerhaft wäre. Wir benutzten 1-ccm-Pipetten, die besonders tadellos gereinigt waren, um ein Anhaften der Lösung an der Innenwand der Pipette zu vermeiden, und zwar gingen wir so vor, daß wir bei Reaktionen, die gegenseitig miteinander verglichen werden sollten, stets denselben Teil der Pipette benutzten (also beide Male z. B. 0,0 bis 0,2 oder 0,2 bis 0,4 ccm); Auf diese Weise lassen die geschilderten Fehlermöglichkeiten, die keineswegs unterschätzt werden dürfen, sich wenigstens einigermaßen ausschalten. Bei doppelt angesetztem Hauptversuch machten wir eine Bestimmung mit 1,0 ccm 0,2 $^{0}/_{0}$iger Ninhydrinlösung; die in allen Röhrchen gleichmäßig etwas stärkere Verdünnung ist ohne Bedeutung.

Nach diesen ganzen Ausführungen ist es unseres Erachtens erwiesen, daß bei genauester Innehaltung der Abderhaldenschen Technik noch zahlreiche Fehler mit unterlaufen können, die einen positiven Abbau von Substrat vortäuschen können, wo er gar nicht stattgefunden hat. Bei subtilster Technik lassen sich eine Reihe dieser Fehlermöglichkeiten ausschalten, doch ist es nicht möglich, den Summationseinwand durch irgendeine Versuchsanordnung mit Sicherheit in jedem einzelnen Falle auszuschließen.

Die zahlreichen fehlerhaften Resultate, die wir bei unseren Kontrolluntersuchungen erhielten, können aber nicht nur durch Lücken in der Technik erklärt werden.

Wir beschränkten uns bei unseren Untersuchungen am Menschen hauptsächlich auf die serologische Diagnose der Gravidität, weil hier in jedem Fall klinisch die Diagnose gesichert werden kann. Hierbei wurden unsere Kontrolluntersuchungen bald durch eine präzise Vorschrift Abderhaldens in bestimmte Richtung gelenkt. Abderhalden schreibt näm-

lich als eine Kontrolle für tadellose Beschaffenheit der zu verwendenden Placenta vor, daß eine Placenta nur dann als einwandfrei präpariert angesehen werden darf, wenn sie durch Serum von Carcinomatösen und Salpingitiden niemals abgebaut wird.

Um das Resultat vorwegzunehmen, so müssen wir bemerken, daß es uns niemals gelungen ist, eine Placenta so zu präparieren, daß sie dieser Anforderung ausnahmslos genügte, und zwar traf dies sowohl bei den Placenten zu, die wir nach Alderhaldens Vorschrift präparierten als auch bei Verarbeitung nach unserer Methode. Im übrigen scheinen die in der Literatur festgelegten Befunde diese Tatsache vollkommen zu bestätigen; alle Untersucher, die eine größere Anzahl von Carcinom- und Salpingitisfällen untersuchten, geben mehr oder minder häufige falsche Resultate an. Eine größere Untersuchungsreihe über Carcinom- und Salpingitisserum mit ausnahmslos richtigen Resultaten hat bis jetzt noch kein Untersucher veröffentlicht. Die Verhältnisse lagen so, daß unsere Placenten so reagierten, daß sie mit einzelnen Seren von Carcinomatösen und Salpingitiden zwar negativ, mit zahlreichen anderen dagegen positiv reagierten. Da uns von vornherein diese Unsicherheit auffiel, so richteten wir unser Hauptaugenmerk auf die Frage, welche Erkrankungen einen unspezifischen Abbau geben, in welchem Prozentsatz und in welcher Stärke sie dies tun.

Fälle von Schwangerschaft haben wir über 40 untersucht; es stellte sich dabei heraus, was auch durch die Untersuchungen anderer Autoren immer wieder bestätigt wird, daß im Stadium vorgeschrittener Gravidität — also im 8. bis 9. Monat — fast ausnahmslos Placenta abgebaut wird. Dieser Abbau verschwindet meist in den daraufhin untersuchten Fällen einige Zeit nach Entbindung. Eine Frühdiagnose der Gravidität in den ersten 3 Monaten war uns mit dem Abderhaldenschen Dialysierverfahren nicht möglich, da hierbei die Resultate ganz unregelmäßig ausfallen; aber auch in späteren Stadien der Gravidität bekommt man manchmal negative Resultate.

Bei fieberhaften Erkrankungen, Appendicitis, fieberhafter Tuberkulose usw. erhielten wir außerordentlich zahlreiche unspezifische Reaktionen, aber auch bei nicht fieberhaften Er-

krankungen wie Gonorrhöe mit Salpingitis, Lues, Myomen und besonders häufig bei Carcinom.

Unsere Untersuchungen mit der Dialysiermethode bei Nichtgraviden gegen Placenta als Substrat belaufen sich auf die Untersuchung von über 170 Seren mit mehreren Hundert Einzeluntersuchungen, da wir je nach der vorhandenen Menge von Serum möglichst viele Kontrollen mit ansetzten.

Die Fehlresultate schwankten bei den verschiedenen Erkrankungen zwischen 30 und 65 %, was wir aber mehr auf Zufälligkeiten in der Zusammensetzung des Materials zurückzuführen geneigt sind.

Jedenfalls geht aus diesen Resultaten hervor, daß die positiven Resultate bei Gravidität keineswegs für die Brauchbarkeit der Reaktion für praktische Zwecke beweisend sind, da positiver „Abbau von Placenta" bei anderen Erkrankungen so häufig ist, daß man aus dieser Tatsache keinen Schluß auf das Vorhandensein einer Placenta ziehen darf. Auch der regelmäßige „Abbau" von Placenta und anderen Substraten durch Meerschweinchenserum spricht sehr gegen die Spezifität der gegen Placenta eingestellten Serumfermente.

Wir müssen noch ganz besonders darauf hinweisen, daß die Resultate von Untersuchern, die nur Gravide *und zur Kontrolle* Gesunde untersuchten, in keiner Weise verwertbar sein können, da diese Resultate selbstverständlich angesichts der vielen positiven Reaktionen in Fällen, wo eine Gravidität mit Sicherheit auszuschließen ist, praktisch keine Bedeutung haben. Jeder Untersucher müßte unseres Erachtens, wenn er ein Urteil über die praktische Brauchbarkeit des *Abderhalden*schen Dialysierverfahrens fällen will, angeben, in welchem Prozentsatz und bei einer wie großen Reihe von Fällen er imstande war, die Forderung *Abderhaldens* zu erfüllen, daß die präparierte Placenta durch Serum von Carcinomatösen und Salpingitiden nicht abgebaut wurde. Wir waren, wie gesagt, nicht imstande, diese Forderung zu erfüllen, konnten uns auch trotz eifriger Bemühungen nie aus anderen Laboratorien in den Besitz einer Placenta setzen, die diese Bedingungen erfüllt hätte.

Es könnte nun der immer wiederholte Einwand gemacht werden, daß unsere Placenten nicht vollkommen blutfrei ge-

waschen waren; wenn wir nun auch der Ansicht sind, daß es unmöglich ist, eine Placenta auch nur annähernd so blutfrei zu waschen wie etwa irgendein dem frisch getöteten Tiere entnommenes Organ, so müssen wir doch betonen, daß unsere Placentarbereitung zu einwandfreieren Präparaten führen muß wie die eigentliche Abderhaldensche Technik, da Abderhalden die Blutkörperchenstromata unberücksichtigt läßt, die sich, wie wir zeigen konnten, in dieser Hinsicht von den Gesamtblutkönperchen kaum unterscheiden.

Wir sind nun aber in der Lage, experimentell zu beweisen, daß die häufig erzielten unspezifischen positiven Resultate nicht lediglich auf die Bluthaltigkeit der Organe zurückgeführt werden können.

Wir untersuchten Seren gleichzeitig gegenüber koagulierter Placenta und gegenüber gewaschenen koagulierten Menschenblutkörperchen; es stellte sich bei dieser Art der Kontrolluntersuchung heraus, daß ein Teil der Seren Placenta unspezifisch abbaute, die im Kontrollversuch mit Blutkörperchen keinen Abbau gezeigt hatten; zum mindesten in diesen Fällen ist es unmöglich, die falschen Resultate auf die Bluthaltigkeit der Organe zurückführen zu wollen.

Zum Schluß wollen wir noch ganz kurz über unsere Tierversuche berichten, die hauptsächlich in der Absicht unternommen wurden, festzustellen, wie empfindlich das Dialysierverfahren ist gegenüber bekannten serologischen Untersuchungsmethoden in Fällen, wo man beide Untersuchungsverfahren heranziehen kann, dann wollten wir hier die Frage der Spezifität noch einmal prüfen, wo zum mindesten die Substratbereitung viel einwandfreier gelingen muß als z. B. bei Verarbeitung von Placenta.

Wir immunisierten Kaninchen mit Pferdeserum, es war uns dabei nie möglich, mit dem Dialysierverfahren nach 4 Tagen bereits Serumfermente nachzuweisen. Einwandfrei gelang dieser Nachweis immer nur dann, wenn man mit Präzipitation und Komplementablenkung bereits grobe Ausschläge erzielte, die in keiner Weise die Unsicherheit besitzen wie eine minimalste Differenz im Ausfall zweier Ninhydrinreaktionen.

Betreffs der Spezifität machten wir Tierversuche mit Bakterien der Typhus-Coligruppe; es handelte sich hierbei um Ver-

suche an Pferden, Kaninchen und Ziegen. Es stellte sich hierbei nun heraus, daß z. B. Kaninchen, die vor Behandlung Typhusbacillen nicht abbauten, dies nach Behandlung taten; eine spezifische Reaktion, wie es danach ohne Kontrollen aussehen könnte, war dies aber keineswegs, da derartige Seren außer anderen Unregelmäßigkeiten regelmäßig Paratyphus B abbauten, und umgekehrt Seren von Tieren, die mit Paratyphus B immunisiert waren, ausnahmslos Typhus abbauten, und zwar in einem Stadium der Immunisierung, wo serologisch die Unterscheidung zwischen Typhus und Paratyphus B gar keinem Zweifel mehr unterliegen konnte. Meerschweinchenseren bauten wahllos jedes Substrat ab. Wir sind zwar überzeugt, daß die fermentartigen Antikörper sehr spezifisch sind, aber die Abderhaldensche Methode ist nicht imstande, diese Spezifität aufzudecken, weil sie für die Feststellung quantitativer Unterschiede ungeeignet ist.

Wir möchten demnach behaupten, daß es keineswegs genügt, bei Tierexperimenten nachgewiesen zu haben, daß nach Injektion gewisser Bakterien Serumfermente auftreten, die diese Bakterien abbauen, da erst die Spezifität dieser Serumfermente erwiesen sein müßte, was aber niemals gelingt, wenn man genügend andere Bakterien zu Kontrolluntersuchungen daneben verwendet.

Zum Schluß möchten wir noch auf einen Punkt hinweisen: die Serumfermente bauen Substrate ab, wo man häufig serologisch auch eine Lösung des betreffenden Substrates beobachten kann, z. B. Blutkörperchen, Typhusbakterien usw., d. h. Cytolyse und Serumfermentwirkung gehen in allen vergleichbaren Fällen parallel, nur in einem Fall soll eine Ausnahme bestehen, worauf noch nicht hingewiesen wurde, nämlich bei Seren von Carcinomatösen. Während Carcinomzellen durch das Serum Normaler aufgelöst, durch Carcinomserum aber unbeeinflußt gelassen werden (Freund-Raminer), soll umgekehrt bei gekochtem Carcinom das Serum von Carcinomatösen „abbauen“, das Serum von Normalen dagegen nicht. Dies wäre eine höchst auffallende Divergenz in den Befunden mit allen übrigen Substraten und denen bei Carcinom; daß die Carcinomzellen gekocht sind, kann diesen Unterschied nicht bedingen, da auch bei den übrigen Substraten inklusive Organzellen hier-

durch keine Umkehr in der Wirkung der Antikörper hervorgerufen wird.

Betreffs Untersuchung mit der serologischen Carcinomdiagnostik stehen uns nicht genügende Erfahrungen zu Gebote, um ein abschließendes Urteil fällen zu können. Jedenfalls fielen unsere Versuche nicht so aus, daß wir sie in größerem Maßstabe fortzusetzen wünschten. Zum mindesten können wir aus unseren eigenen Erfahrungen hierüber soviel sagen, daß der so häufige Abbau von Placenta durch Carcinomseren nicht sehr für die Spezifität des Abbaus von Carcinom durch Carcinomseren spricht. Die Fehlermöglichkeiten jedoch, die durch die Technik an sich bedingt sind, und die wir ausführlich auseinandergesetzt haben, gelten für die Serodiagnose des Carcinoms ebenso wie für die der Gravidität.

Mit der optischen Methode haben wir uns nicht beschäftigt; doch muß dies als ganz irrelevant angesehen werden, da ja Abderhalden mit dem Dialysierverfahren so ausgezeichnete Resultate erhielt (unter 600 Untersuchungen auf Gravidität ein bis zwei Fehlresultate), daß dadurch eine Kontrolle durch das optische Verfahren unnötig wäre. Auch müßte die Dyalisiermethode und nicht die optische Methode die Methode der Praxis sein; nachdem wir nun mit dem Dialysierverfahren, mit dem auch fast alle übrigen Autoren ihre bestätigenden Befunde erzielten, in über ein Jahr dauernder Arbeit in unserem Laboratorium keine praktisch brauchbaren Resultate zu erzielen imstande waren, verzichteten wir darauf, uns auch noch auf die optische Methode einzuarbeiten.

Zusammenfassung.

Bei der Herstellung der Placenten für das Dialysierverfahren werden nach Möglichkeit Placenten ausgeschaltet, die von kranken Individuen stammen konnten (Lues, Nephritis usw.).

Bei der mechanischen Bearbeitung muß ein zu langes Verreiben im Mörser vermieden werden, da sonst immer mehr spezifisches Substrat verloren geht und reines Bindegewebe zurückbleibt. Der Verlust an bestem, spezifischem Substrat kann durch Filtration des Waschwassers vermieden werden. Bei dem von uns angegebenen Verfahren wird unter optimalen

Bedingungen das Chorionzottengewebe zurückbehalten bei Ausscheidung des Bindegewebes.

Zwecks Enfernung des Blutes aus den Substraten ist Leitungswasser gänzlich ungeeignet, da hierbei das gelöste Hämoglobin entfernt wird unter Zurücklassung der Stromata. Dies kann nur durch Auswaschen der maximal zerkleinerten Placenten mit Kochsalzlösung geschehen. Stromata verhalten sich gegenüber Seren, die Blutkörperchen abbauen, ebenso wie Gesamtblutkörperchen.

Beim Auskochen der Organe ist auf den ungenügenden Koagulationszustand, in dem sich das Eiweiß befindet, zu achten. Bei weiterem Auskochen mit destilliertem Wasser geht immer wieder Eiweiß in Lösung, was bei genügender Konzentration eine positive Ninhydrinreaktion erzeugen kann trotz dessen Unempfindlichkeit für genuines Eiweiß. Eine positive Auskochprobe ist nicht beweisend dafür, daß sich in dem aufbewahrten Organ — etwa durch Bakterienwirkung — immer wieder tiefere Eiweißspaltprodukte gebildet hätten.

Die Hülsenprüfung nach Abderhalden ist ungenügend und muß schon allein gegebenenfalls in einem gewissen Prozentsatz zu falschen Resultaten führen. Durch verschieden häufiges Auskochen werden die Hülsen so schnell verändert, daß sie keine exakten Resultate ergeben können.

Für Eiweiß sind die meisten Hülsen undurchlässig. Eine Prüfung des Dialysats auf genuines Eiweiß mit der Biuret- oder gar Ninhydrinprobe kann keinen Vergleich aushalten mit empfindlichen Eiweißreagenzien wie Spiegler, Sulfosalicylsäure usw. Hülsen, deren Dialysat gegenüber diesen Reagenzien sich als eiweißfrei erwies, können als eiweißundurchlässig betrachtet werden.

Bei der Prüfung auf Peptondurchlässigkeit ist eine bedeutend schwächere Lösung von Seidenpepton vorzuziehen, da bei stärkeren Lösungen feine Differenzen in der Durchlässigkeit übersehen werden müssen. Diese Differenzen können in verdünnten Lösungen so stark sein, daß sie gegebenenfalls zu falschen Resultaten führen müssen.

Es ist unmöglich, nur Hülsen von einer bestimmten Durchlässigkeit für Peptone zu verwenden. Stark differente Peptondurchlässigkeit führt zu verschiedenen Resultaten.

Wenn die Hülsen nur alle 4 Wochen einer Neuprüfung unterzogen werden, so muß dies zu falschen Resultaten führen; eine jedesmalige Hülsenprüfung auf Peptondurchlässigkeit vor jedem Gebrauch ist unumgänglich notwendig.

Es werden Vorschriften über Hülsenreinigung, Beschickung der Hülsen, Vermeidung bakterieller Verunreinigungen gegeben.

Bei der Gewinnung der Seren wurde auf absolute Hämoglobinabwesenheit gesehen, trotzdem konnte versuchsweise zugesetztes Hämoglobin nichts an dem definitiven Ausfall des Resultats ändern.

Es ist schwer, bei Doppelbestimmungen kongruente Resultate zu erhalten. Bei der von Abderhalden gegebenen Technik ist dies unmöglich und läßt sich nur durch verfeinerte Hülsenprüfung bis zu einem gewissen Grade ausschalten.

Eine stärkere positive Ninhydrinreaktion im Versuch Serum + Placenta ist nicht beweisend für „Abbau"; derartige Verhältnisse können auch durch Summation unspezifischer Komponenten geschaffen werden (Summationseinwand).

Versuche mit inaktivierten Seren (halbstündiges Erhitzen auf 60°) führten nicht zu gleichmäßigen Resultaten; es ist unmöglich, aus der Differenz im Ausfall der Ninhydrinreaktion in den beiden Versuchen (aktives Serum + Placenta) und (inaktives Serum + Placenta) auf stattgehabten Abbau zu schließen, da auch andere Faktoren eine derartige Differenz bedingen können.

Hülsenfehler können eventuell durch Benutzung von exakten Enteiweißungsverfahren gänzlich ausgeschaltet werden. Das eiweißfreie Filtrat kann zur Anstellung der Ninhydrinreaktion oder zur quantitativen Bestimmung des unkoagulablen Stickstoffs benutzt werden.

Es bestehen Differenzen zwischen dem Dialysier- und dem Enteiweißungsverfahren; der Hauptunterschied liegt in der Dialyse gegen destilliertes Wasser, die zu einer Ausfällung der Globuline und damit total veränderten Verhältnissen führt (Dialyse gegen physiologische Kochsalzlösung).

Bei Anstellung der Ninhydrinreaktion können Differenzen durch Verwendung ungeeigneter Reagenzgläser und ungenaue Abmessung der Ninhydrinlösung entstehen; diese Differenzen

sind groß genug, um gegebenenfalls falsche Resultate zu bedingen.

Nach unseren Ausführungen halten wir es für erwiesen, daß die Technik des Dialysierverfahrens in der von Abderhalden angegebenen Form nicht ausnahmslos zu richtigen Resultaten führen kann, selbst wenn die absolute Spezifität der Serumfermentreaktion als erwiesen betrachtet werden könnte.

Von einer Spezifität der Serumfermente konnten wir uns bei unseren Untersuchungen auf Gravidität nicht überzeugen. Auch quantitative Unterschiede zwischen spezifischem und unspezifischem Abbau ließen sich nicht feststellen.

Bei den verschiedenen Erkrankungen erhielten wir zwischen 30 und 65% falsche Resultate.

Die Forderung Abderhaldens, daß Placenten nur dann einwandfrei präpariert sein sollen, wenn sie durch Serum von Carcinomatösen und Salpingitiden nicht abgebaut werden, konnten wir bei keiner der vielen Placenten, die wir präparierten, ausnahmslos erfüllen.

Über das Wesen der violetten Nitroprussidnatriumreaktion im Harn.

Von

Hanakichi Yanagawa (Tokio).

(Aus dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. u. k. Rudolfstiftung in Wien.)

(Eingegangen am 27. Februar 1914.)

I. Einleitung.

In seiner ersten Publikation hat V. Arnold[1]) eine neue Reaktion mit Nitroprussidnatrium im Harn beschrieben, die nach Einnahme von Fleischspeisen in verschiedener Form bzw. von Fleischbrühe oder gebratenem Fleisch auftritt. Versetzt man 10 bis 20 ccm des event. mit Tierkohle entfärbten, nach dem Genuß von Fleisch oder Fleischbrühe ausgeschiedenen Harns mit einem Tropfen 4°/$_0$iger Nitroprussidnatriumlösung und darauf mit 5 bis 10 ccm einer 5°/$_0$igen Natron- oder Kalilauge, so tritt zuerst ein kräftiges, reines Violett auf, das bald in Purpurrot, dann allmählich in Braunrot und in Gelb übergeht. Die violette resp. purpurrote Flüssigkeit zeigt ein Absorptionsband zwischen *D* und *E*, das bei stärkerer Konzentration sogar über *b* hinausreicht. Die violette resp. purpurrote Farbe dieser Reaktion geht auf Zusatz von Essigsäure in Blau über, das rasch verblaßt. Bei Anwendung von Ammoniak (statt NaOH) sind 5 bis 6 Tropfen der Nitroprussidlösung zu verwenden. Diese Reaktion unterscheidet sich von der Weylschen Kreatininreaktion durch die geringe Menge der nötigen Nitroprussidlösung und durch ihre rein violette Farbe. Die letztere zeigt auch spektroskopisch kein Absorptionsband. Die neue Reaktion tritt 20 Minuten nach dem Genuß von Fleisch

[1]) V. Arnold, Eine neue Nitroprussidreaktion des Harnes. Zeitschr. f. physiol. Chem. 49, 1906.

oder Fleischsaft, die selbst die Reaktion nicht geben, im Harn auf. Eine ähnliche Reaktion mit Ammonsalzen erfordert mehr Nitroprussidnatrium, ist persistenter und gelangt im unzersetzten Harn nicht zur Beobachtung. V. Arnold ist daher der Meinung, daß diese Reaktion dem Fleischgenuß eigentümlich sei und daß irgendeine Substanz dabei als endogenes Stoffwechselprodukt — Vorstufe des Kreatinins — ausgeschieden werde.

Danach wurde diese Reaktion von T. Holobut[1]) an einem gesunden Menschen bei verschiedener Diät verfolgt. Nach seiner Untersuchung gab der Harn diese Reaktion nicht allein nach Einverleiben von Fleisch, sondern auch nach Verabreichung von Käse, von Eiern, ferner nach dem Genuß von Grütze, von Erbsen, sowie von Milch und sogar in ausgesprochener Intensität auch nach dem Genuß von Bier. Da bekanntlich auch nach dem Genuß von Fleischbouillon diese Reaktion im Harn sich nachweisen läßt, so wurde von ihm geprüft, ob die Reaktion nicht etwa mit Fleischbouillon direkt gelinge. „In der Pferdefleischbrühe konnte der die violette Reaktion gebende Körper nicht nachgewiesen werden; es trat zwar nach Hinzufügung der entsprechenden Reagenzien genau nach den Angaben von Arnold stets eine Farbenreaktion auf, dieselbe war aber vollkommen verschieden von der von ihm angegebenen violetten Reaktion im Harn.“ Holobut kam daher zu dem Ergebnis, daß diese Reaktion nicht für den stattgehabten Genuß von Fleisch oder Fleischbrühe spezifisch ist, wenn auch eine starke violette Nitroprussidreaktion fast ausnahmslos auf den Genuß von Fleischspeisen zurückzuführen ist. Am Schluß seiner Arbeit spricht Holobut die Ansicht aus, daß die violette Nitroprussidreaktion am deutlichsten nach Aufnahme stark eiweißhaltiger Nahrung zum Vorschein komme.

Ildebrando Caretti[2]) untersuchte auch den Harn eines bei verschiedener Diät gehaltenen Individuums auf die Arnoldsche Reaktion. Auf Grund der erhaltenen Resultate nimmt Caretti an, daß die Reaktion ungefähr eine Stunde nach Zufuhr von Fleisch oder Fleischbrühe im Harn auftritt, während zwei Stunden nachzuweisen ist und hierauf rasch verschwindet.

---

[1]) Theophil Holobut, Über Arnolds Harnreaktion mit Nitroprussidnatrium. Zeitschr. f. physiol. Chem. 56, 1908.

[2]) I. Caretti, Bull. scienze med. 80, 253, 1909.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Holobut konnte er die Arnoldsche Reaktion nach Zufuhr anderer Nahrungsmittel, wie Milch, Käse, Eier, nicht wahrnehmen. Die die Reaktion auslösende Substanz ist sehr empfindlich und verschwindet nach einigen Tagen, selbst wenn der Harn mit Sublimatlösung aufbewahrt wird.

Im Anschluß an Holubuts Arbeit hat Arnold[1]) über den Einfluß der Eiweißkörper auf die Entstehung des mit Nitroprussidnatrium reagierenden Körpers gearbeitet. Er hat einige Versuche bei gesunden Menschen mit verschiedenen Nährstoffen (Eiern, Nutrose, Semmeln, Butter, Zucker, Bier, Liebigs Fleischextrakten etc.) vorgenommen. Er kam zu dem Schluß, daß die reinen Nährstoffe (Eiweißkörper und Kohlenhydrate) auch eine schwache Nitroprussidreaktion hervorzurufen imstande sind. Er hat daher seine erste Behauptung, daß der seine Reaktion gebende Körper im Harn exogenen Ursprungs sei, aufgegeben und die Meinung ausgesprochen, daß der Körper einem endogen entstandenen Harnbestandteile entspricht. Die intensivste Reaktion wurde jedoch nach Einverleibung des fast keinen Nährstoff enthaltenden Beaftea beobachtet. Diese Tatsache glaubt Arnold als Folge der Wirkung der aus dem Fleisch extrahierten Nähr- und Würzstoffe auf die tierischen Zellen auffassen zu müssen. Schließlich hat Arnold die interessante Beobachtung hinzugefügt, daß die neue Reaktion auf der Höhe schwerer Infektionskrankheiten (Typhus) fast vollständig verschwindet.

Trotzdem diese von V. Arnold angegebene Harnreaktion eine recht häufig beobachtete Erscheinung ist und die ihr zugrunde liegende Substanz gewiß ein unbekannter normaler Harnbestandteil ist, hat sie bisher keine genügende Beobachtung erfahren. Man weiß ja über den Ursprung, Entstehungs- und Ausscheidungsweise, chemische Eigenschaften und biologische Bedeutung des Körpers gar nichts.

II. Über Ausscheidung dieses Reaktionskörpers im Harn und seinen Ursprung.

Um dieser Frage näherzutreten, habe ich zuerst diese Reaktion im Harn im Nüchtern- oder Hungerzustande und

[1]) V. Arnold, Weitere Beobachtungen über die Arnoldsche Harnreaktion mit Nitroprussidnatrium 83, 1913.

nach Genuß von Fleischbouillon oder gebratenem Fleisch bei gesunden Menschen, Hunden und Kaninchen und den von Arnold angegebenen Maßregeln untersucht. Es fehlte die Reaktion im Nüchtern- und Hungerharn gesunder Menschen und Tiere immer vollständig, während sie im Harn nach Aufnahme von Fleischspeisen immer sehr intensiv nachgewiesen wurde. In einigen Fällen habe ich zeitliche Verhältnisse der Ausscheidung dieses Reaktionskörpers genau untersucht, indem ich den Harn nach Genuß von Fleischbouillon oder Braten zweistündig auf diese Reaktion prüfte. Nach meinem Untersuchungsresultat scheint die Reaktion in der Zeit, wo die Verdauungstätigkeit des Darmes am lebhaftesten ist, auch am deutlichsten ausgeprägt zu sein. Sie beginnt schon $^1/_2$ Stunde nach dem Essen oder Trinken und dauert 5 (Bouillon) bis 12 Stunden (Fleisch).

Tabelle I.

Die Arnoldsche Reaktion im Harn nach dem Genuß von verschiedenen Nahrungsmitteln.

Nahrungsarten	Bei Menschen (59 bis 65 kg)	Bei Hunden (6 bis 8 kg)	Bei Kaninchen (2,8 bis 4,0 kg)
Gewöhnliche Kost	++	+	Hafer + Rüben +
Rostbeaf	+	$^1/_2$ kg +	—
Schinken	200 g 0	50 g 0	—
Gebratenes Fleisch	$^1/_2$ kg ++	$^1/_4$ kg ++	$^1/_4$ kg ++
Fleischbrühe	400 ccm ++	100 ccm +	80 ccm +
Gekochte Milch	1 l +	$^1/_2$ l 0	$^1/_4$ l 0
Liebigs Fleischextr.	2 Eßlöffel 0	2 Eßlöffel 0	—
Witte-Pepton	50 g 0	20 g 0, 40 g 0	15 g 0, 20 g 0
Eier	7 Stück 0	—	—
Casein	—	50 g 0	—
Fibrin	—	20 g 0	—
Fibrin m. HCl gekocht	—	20 g 0	—
Fibrin mit Pankreatin verdaut	—	20 g 0	—
Semmel	4 Stück +	2 Stück +	Stück +
Traubenzucker	50 g 0	30 g 0, 50 g +	20 g ±, 40 g +
Rohrzucker	200 g ±	—	—
Bier	$^1/_4$ l +	—	—
Alkohol	10 g 0	—	—
Milchzucker	—	40 g 0 u. ±	30 g +
Kuchen, Rohrzucker	+	—	—
Butter	100 g ±	—	—
Paprika, 3 Stück	+	—	—
Französ. Senf	20 g ±	—	—
Zwiebel	3 Stücke +	—	—
Rhodankali	0,5 g 0	—	—
Salol	—	—	0

Zunächst habe ich diese Reaktion im Harn nach Genuß von verschiedenen Nahrungsstoffen bei Menschen und Tieren untersucht, um zu wissen, bei welchem Nährstoffe die Nitroprussidreaktion im Harn am stärksten auftritt oder ganz fehlt. Die Tabelle I zeigt diese Verhältnisse. Die Prüfung auf die Reaktion wurde immer 2 bis 3 Stunden nach der Einverleibung von Nahrung ausgeführt, wo gewöhnlich die Reaktion im Harn am deutlichsten auftritt. Versuchspersonen oder Tiere waren vor dem Versuche immer im Hungerzustande.

Unsere Untersuchungsresultate stimmen in einigen Fällen nicht mit denen überein, die von Arnold und Holobut ausgeführt wurden. Aber Fleischbouillon oder gebratenes Fleisch ließen auch bei uns die violette Reaktion im Harn am intensivsten nachweisen, während andere Nährstoffe, Kohlenhydrate (Traubenzucker usw.), Eiweißkörper (Witte-Pepton usw.) oder Fette (Butter usw.) nur ganz spurweise oder gar nicht die Reaktion im Harn nachweisen lassen. Die violette Nitroprussidreaktion ist also für Fleischgenuß nicht charakteristisch, doch ist sie dem Fleischharn insofern eigentümlich, daß man in Fällen, wo sie stärker positiv im Harn auftritt, einen vorausgegangenen Fleischgenuß annehmen kann.

Welches ist nun die Muttersubstanz unseres Reaktionskörpers? Ist die auffallende Wirkung des Fleischextraktes für die Entstehung der Arnoldschen Reaktion wirklich auf Reizstoffe oder Geschmacksubstanzen zu beziehen? Um diese Frage mehr zu klären, habe ich zuerst folgende Untersuchung vorgenommen. Nachdem ein Hund 3 Tage lang nicht gefüttert wurde, wurde ihm ein wohlschmeckendes gebratenes Stück Fleisch stundenlang vor Augen gehalten, währenddessen mehrmals Harn katheterisiert und auf die Reaktion geprüft; der Harn gab aber niemals positive Reaktion. Es scheint daher der psychische Einfluß, d. h. Reizung der Verdauungszellen durch Wohlgeschmack, keine Rolle auf die Ausscheidung des Arnoldschen Körpers zu spielen. Wir müssen also die Herkunft dieser Reaktion in einem materiellen Substrat in der Fleischbouillon suchen.

Während V. Arnold die der neuen Reaktion zugrunde liegende Substanz in Bouillon und Braten nicht nachweisen konnte und Holobut die Farbenreaktion durch Nitroprussidnatrium in der Pferdefleischbrühe von der Arnoldschen Re-

aktion im Harn vollkommen verschieden deutete, scheint es doch wahrscheinlich, daß in der Bouillon oder im Braten auch eine Substanz enthalten ist, die eine mit der Arnoldschen Reaktion ganz ähnliche Reaktion gibt und nicht nur in bezug auf die Farbenreaktion, sondern auch auf alle anderen chemischen Eigenschaften, wie ich im nächsten Kapitel erwähnen werde, mit dem Arnoldschen Körper im Harn übereinstimmt. Wenn man die nicht zu lange gekochte Bouillon (kocht man zu lange, so verschwindet die Substanz!) oder Wasser, mit dem der Braten einen Tag digeriert war, im Vakuum bei 35 bis 40° einengt, mit Tierkohle entfärbt und auf die Farbenreaktion prüft, so tritt die Violettreaktion, wie im Harn, mehr oder minder deutlich auf.

Durch dieses Resultat erscheint es sehr wahrscheinlich, daß die die Arnoldsche Reaktion auslösende Substanz in der Bouillon oder im Fleischextrakt enthalten ist, von der Darmwand resorbiert, durch die Niere ausgeschieden wird und im Harn die eigentümliche Reaktion verursacht. Dafür spricht auch der Umstand, daß die Reaktion nach Genuß von Fleischspeisen sehr rasch im Harn auftritt und sehr rasch daraus verschwindet, wie man oft nach Aufnahme von verschiedenen körperfremden Substanzen sieht. Doch muß man andererseits die quantitativen Verhältnisse des Reaktionskörpers im Fleisch und im Harn berücksichtigen. Man sieht in der Fleischspeise eine relativ geringere Menge (schwache Reaktion) von dieser Substanz, während sie nach Darreichung von Fleischspeisen an Menschen und Tiere sehr reichlich (starke Reaktion) im Harn ausgeschieden wird. Wie ich schon in der Tabelle gezeigt habe, tritt der Körper sogar auch nach dem Genuß von verschiedenen Nahrungsmitteln, die für sich keine die Arnoldsche Reaktion hervorrufende Substanz enthalten, im Harn auf, wenn die Reaktion selbst auch in den letzteren Fällen sehr viel schwächer nachgewiesen wird. Es muß also für die Entstehung und Ausscheidung dieses Reaktionskörpers außer der Substanz, die als solche vorgebildet ist, noch irgendeine Muttersubstanz in der Nahrung oder irgendwo im Organismus und ein besonderer Chemismus mit im Spiel sein, um aus der die Arnoldsche Reaktion nicht gebenden Muttersubstanz die eigentliche Substanz zu erzeugen. Zur Eruierung dieser Muttersubstanz wurde folgender Versuch gemacht.

Zuerst wurde Bouillon untersucht, die von der die Arnoldsche Reaktion gebenden Substanz befreit war. Weil der Reaktionskörper gegen Alkali sehr empfindlich ist, so wurde die kräftige Bouillon mit NH_3 oder NaOH stark alkalisch gemacht, nach 3 bis 4 Stunden mit Essigsäure neutralisiert und den Tieren per os dargereicht; 2 bis 3 Stunden danach wurde katheterisiert und auf die Reaktion geprüft. Der Harn zeigte nach Einverleibung einer großer Menge (200 g) derselben 2 mal unter 3 Versuchen eine nicht verkennbare positive Reaktion, deren Intensität aber, der Holobutschen Beobachtung widersprechend, unvergleichbar schwächer als bei Einverleibung der originalen Bouillon war, während in einem Falle die Reaktion vollständig ausblieb.

Der Gehalt an Eiweiß in der Bouillon scheint keine Rolle für die Arnoldsche Reaktion zu spielen. Es wurde eine kräftige Bouillon mit NaCl und Essigsäure enteiweißt, dem Hunde und dem Kaninchen per os gegeben, und der Harn nach 2 bis 3 Stunden entnommen und auf die Reaktion geprüft. Der Harn zeigte auch jetzt eine ziemlich starke positive Reaktion. Ebenso wies der Harn nach dem Genuß von enteiweißter und von der Arnoldschen Reaktion befreiter Bouillon die positive Reaktion auf.

Ferner habe ich noch folgenden Versuch gemacht: Kräftige Bouillon mit positiver Arnoldscher Reaktion wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt, das Filtrat mit Barytwasser stark alkalisch gemacht, sofort Kohlensäure eingeleitet und abfiltriert, das Filtrat mit Essigsäure schwach angesäuert, im Vakuum bei 35 bis 38° eingeengt (die Arnoldsche Reaktion noch nachweisbar) und diese Flüssigkeit, die einer Bouillon von 100 und 200 ccm entspricht, dem Hunde per os eingegeben. Der Harn zeigte nach 2 bis 3 Stunden eine ganz schwache positive Reaktion.

Daß die von dem Arnoldschen Körper befreite Bouillon nach ihrer Einverleibung auch die charakteristische Violettreaktion im Harn nachweisen läßt, ist schon ein Beweis dafür, daß der Arnoldsche Körper sowohl als exogenes als auch als intermediäres Stoffwechselprodukt in den Harn ausgeschieden wird. Doch wollte ich noch untersuchen, ob die Entstehung dieses Reaktionskörpers wirklich von der Resorptionstätigkeit

des Darmes abhängig ist. Zu diesem Zwecke wurde bei je zwei fast gleichgroßen Hunden und Kaninchen im Hungerzustande eine gleiche Menge von Bouillon oder Traubenzuckerlösung einerseits per os und andererseits per injectionem eingegeben, danach im Laufe von 4 Stunden 2 mal katheterisiert, die ganze Menge des Harns gesammelt und die Intensität der Reaktion an beiden Urinen verglichen (Tabelle II). Natürlich war bei den Traubenzuckerversuchen die Harnmenge sehr groß, so daß man den Harn im Vakuum bis auf $^1/_8$ Volumen einengen mußte.

Tabelle II.

	2 Hunde 6,5 kg			2 Kaninchen 3 kg		
	per os		per inject.	per os		per inject.
Gewöhnliche Bouillon (A.R.+)	100 g +	>	100 g +	40 g +	>	40 g +
Enteiweißte „ (A.R. 0)	200 g +	>	200 g +	50 g +	>	40 g +
Alkalisierte „ (A.R. 0)	200 g +		200 g 0	—		—
Traubenzucker in . . . . }	30 g +		30 g 0	20 g 0		20 g 0
Wasser gelöst (A. R. 0) . }	60 g +		60 g 0	40 g +		40 g 0

Bei den Bouillonversuchen war die Intensität der Reaktion im Harn nach der Eingabe per os gewiß immer stärker als bei Einverleibung per injectionem, während die Reaktion im Harn bei den Traubenzuckerversuchen per injektionem überhaupt niemals nachgewiesen wurde.

Da es sehr interessant schien, dem Schicksal dieses in der Fleischbrühe resp. Fleischextrakt violette Nitroprussidnatriumreaktion gebenden Körpers im tierischen Körper nachzuforschen, wurden 4 Hunde und 1 Kaninchen seziert und folgende Versuche gemacht (Tabelle III).

Da der Arnoldsche Körper leicht dialysierbar ist, wie später erwähnt wird, habe ich zur Prüfung der Reaktion im Mageninhalt usw. die Dialysierungsmethode verwendet. Magen-, Dünn-, Dickdarminhalt und Harn (je 10 bis 20 ccm) wurde in Pergamentpapier eingebunden und Toluol zugesetzt, als Außenflüssigkeit dienten 20 bis 40 ccm Wasser mit Toluol. Nach 24 stündigem Stehenlassen im Brutofen bei 37° wurde die Außenflüssigkeit auf die Arnoldsche Reaktion geprüft. Kot wurde zuerst im Wasser zerrieben; Galle zuerst mit Tierkohle entfärbt, Blut zuerst zentrifugiert und von Blutkörperchen abgetrennt und dann dialysiert. Auch wurden, wo nötig, Schwefelwasserstoff und Indol durch geeignete Maßnahmen entfernt.

Tabelle III.

Arnolds Reaktion	in der Nahrung	im Mageninhalt	im Dünndarminhalt	im Dickdarminhalt	im Kot	in der Galle	im Blut	im Harn
1. Hund im Hungerzustand	—	—	0	0	0	0	0	0
2. Hund 3 Std. nach Bouilloneingabe	+	+	+	+	0	0	0	++
3. Hund 3 Std. nach Braten-eingabe	+	+	+	+	0	0	0	++
4. Hund 3 Std. nach Eingabe der von der A. R. befreiten Bouillon . . .	0	0	0	0	0	0	0	+
5. Kaninchen, 3 Std. nach Hafereingabe	0	0	0	0	0	0	0	+

Nach diesem Resultat können wir fast sicher schließen, daß der die Arnoldsche Reaktion gebende Körper teils exogen mit der Nahrung aufgenommen wird, teils als ein durch intermediären Stoffwechsel entstandener Körper in den Harn ausgeschieden wird. Im letzteren Falle wird dieser Körper im Magendarmkanal selbst als solcher nicht gebildet, sondern irgendeine Muttersubstanz in der Nahrung wird vom Darmkanal resorbiert, und von den Körperzellen umgebaut und in den Harn als der charakteristische Körper ausgeschieden.

Sehr merkwürdig scheint es, daß das Witte-Pepton und der Liebigsche Fleischextrakt — die beiden sind ganz frei von dem Arnoldschen Reaktionskörper —, per os und per injectionem eingegeben, niemals positive Arnoldsche Reaktion im Harn hervorrufen können (Tabelle IV).

Tabelle IV.

	Menschen (59 bis 66 kg)		Hunde (6 kg)		Kaninchen (2,8 kg)	
	per os	per inj.	per os	per inj.	per os	per inj.
Rohes Witte-Pepton .	50 g 0	—	20 g 0	20 g 0	10 g 0	—
„ „ „ .	100 g 0	—	40 g 0	—	20 g 0	—
Gekochtes „ „ .	100 g 0	—	40 g 0	—	20 g 0	20 g 0
Künstl. verdautes Witte-Pepton	50 g 0	—	25 g 0	25 g 0	10 g 0	—
Liebigs Extrakt . . .	2 Löffel 0	—	2 Löffel 0	2 Löffel 0	—	—

Das spricht dafür, daß Eiweißkörper, Harnstoff, Kreatin und Kreatinin für die Bildung des Arnoldschen Körpers ohne

Belang sind. Liebigs Fleischextrakt ist zwar nichts anderes als eine konzentrierte Fleischbouillon, da sie aber eine alte Bouillon ist, ist darin schon die flüchtige Substanz, die durch Nitroprussidnatrium und Alkali die Violettreaktion gibt, verschwunden.

Andererseits gibt der Vogelharn, der weder Harnstoff noch Kreatinin enthält, bei der gewöhnlichen Fütterung oder bei der Einverleibung von Fleischbouillon keine positive Arnoldsche Reaktion gibt; ich habe einer Gans 50 und 100 ccm gewöhnliche Bouillon subcutan injiziert, danach mehrmals Harn katheterisiert und auf die Arnoldsche Reaktion geprüft. Aber das Resultat war immer negativ. Es scheint also wahrscheinlich, daß die Ausscheidung des Arnoldschen Körpers mit der Harnstoff- oder Kreatininausscheidung einen gewissen Zusammenhang haben könnte.

Schließlich wäre noch das Vorkommen dieses Körpers bei verschiedenen Krankheitszuständen zu erwähnen. Ich habe sehr viele Harne von verschiedenen Kranken auf die Arnoldsche Reaktion geprüft. Darunter war sie in fast allen Diabetikerharnen mehr oder minder deutlich positiv nachweisbar. Dabei wird die Reaktion durch das gleichzeitig vorhandene Aceton im Harn nicht vorgetäuscht, weil die Reaktion im Gegensatz zu der Legalschen Reaktion durch Essigsäurezusatz vollständig verschwindet.

Bezüglich dieser Tatsache, daß die Reaktion in fast allen Tagesharnen der Diabetiker nachgewiesen wird, scheint es mir aber wahrscheinlich, daß sie nicht durch den Krankheitsprozeß selbst, sondern durch die reichliche Zufuhr von Fleischspeisen bei den betreffenden Kranken hervorgerufen wird. Ebensowenig konnte ich solche Krankheitszustände auffinden, bei denen die Krankheit selbst die Rolle der Ursache der Arnoldschen Reaktion im Harn spielen dürfte.

III. Vorkommen dieses Reaktionskörpers in Extrakten tierischer Organe.

Ich habe im vorigen Abschnitt erwähnt, daß eine mit dem Arnoldschen Körper ganz identische Substanz im Muskelextrakt nachweisbar ist. Von großem Interesse ist es ferner, daß die die violette Nitroprussidnatriumreaktion gebende Substanz auch in der Außenflüssigkeit bei der Dialyse verschiedener Körper-

organe konstatierbar ist. Die in den Organextrakten nachweisbare Substanz zeigt in allen Punkten ganz ähnliche Eigenschaften wie der die Arnoldsche Reaktion gebenden Körper im Harn, weshalb ich diese Substanzen für identisch halten möchte. Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung des Arnoldschen Körpers auf die verschiedenen Organe.

Tabelle V.

	Muskel	Magen	Dünndarm und Dickdarm	Pankreas	Leber	Milz	Niere	Nebenniere	Lunge
1. Bei einem an Tbc. gestorbenen Menschen . . .	+	0	0	+	+	0	+	0	0
2. Bei einem an äußerer Verletzung gestorbenen Mann	+	0	0	+	+	0	+	0	0
3. Beim Hunde im Hungerzustand .	+	0	0	+	+	0	+	0	0
4. Beim Hunde nach 3 Std. d. Fleischaufnahme . . .	+	0	0	+	+	0	+	0	0
5. Kaninchen, Hungerzustand . . .	–	0	0	+	+	0	+	0	0

Bei diesen Versuchen wurden frische Muskel oder Organe fein faschiert, in Pergamentpapier eingebunden, mit einer bestimmten Menge von Wasser und Toluol versetzt, gegen Wasser einen Tag lang im Brutofen oder bei Zimmertemperatur dialysiert und im Dialysat auf die Arnoldsche Reaktion geprüft. Die Außenflüssigkeiten sind meistens farblos und ganz klar, daher kann man so ganz reine Farbenreaktionen konstatieren. In diesem Falle scheint das von mir modifizierte Verfahren am geeignetsten zu sein (siehe IV. Kapitel).

Wenn bei diesen Versuchen immer eine bestimmte Gewichtsmenge von Muskel- oder Organgeweben mit einer bestimmten Wassermenge verwendet wird, so kann man konstatieren, welches Organ diesen Reaktionskörper am reichsten enthält. Nach meinen 2maligen Versuchen scheint das Pankreas das Organ mit dem reichsten Gehalt an dem Reaktionskörper zu sein.

Natürlich habe ich auch bei diesen Versuchen auf etwaigen Schwefelwasserstoff, Indol usw. Rücksicht genommen.

Ich halte, wie schon hervorgehoben, die die violette Nitroprussidreaktion gebenden Substanzen, die einerseits im Harn nach dem Genuß von Fleischspeisen, andererseits in Fleischbouillon resp. Fleischextrakten, andererseits in den Dialysaten verschiedener Organe enthalten sind, für ganz identisch. Aber die Frage, warum diese Substanz gerade in den wichtigsten Verdauungsorganen, Leber und Pankreas, am reichsten enthalten ist, zu entscheiden, ist sehr schwer. Doch können wir vermuten, daß die letztgenannten Organe für die Bildung dieses Reaktionskörpers auf endogener Basis irgendeine Rolle spielen.

IV. Eigenschaften dieses Reaktionskörper.

Die die Arnoldsche Reaktion gebenden Harne färben sich mit Millonschem Reagens nur schwach ziegelrot, die Biuretreaktion geben sie nicht, ebenso nicht die Ehrlichsche Diazoreaktion. Mit Eisenchlorid geben sie keine Reaktion, Kupferoxyd wird nach dem Kochen mit Lauge nicht reduziert, Bromwasserreaktion ist nicht nachweisbar.

Ich habe anfangs die Arnoldsche Reaktion nach seinen Vorschriften ausgeführt. Aber nach meinen Erfahrungen ist die 4%ige Nitroprussidnatriumlösung zu konzentriert. Die Reaktion tritt dann immer mit der Kreatininreaktion gemischt ein. Die 5%ige Natronlauge ist auch zu stark, die Reaktion verschwindet dann zu schnell. Um diese Übelstände zu vermeiden, habe ich das Verfahren folgendermaßen modifiziert: statt der 4%igen Nitroprussidnatriumlösung wurde eine 0,2%ige und statt der 5%igen Natronlauge eine 2%ige verwendet. Prüft man mit diesen Lösungen die Reaktion im positiven Harn, so tritt die Reaktion schön und rein auf und bleibt persistenter, während bei negativem Harn durch Zusatz dieser Lösung überhaupt keine Färbung eintritt. Die Empfindlichkeit ist sehr stark, weil die Reaktion dabei von der Kreatininreaktion gar nicht verdeckt wird.

Die bei dem Arnoldschen Körper auftretende Farbenreaktion möchte ich in 4 Phasen scheiden. Es tritt zuerst ein kräftiges und reines Violett auf, das alsbald in Purpurrot und Braunrot und sodann durch Blau und Gelbblau in Gelb über-

geht. Die violette resp. purpurrote Farbe zeigt, wie Arnold schon konstatiert hat, ein Absorptionsband zwischen *D* und *E*. Die blaue oder gelbblaue Farbe ist bei dem nativen Harn nicht so stark ausgeprägt. Wenn man aber den Harn mit Bariumchloridlösung oder Bleiessig versetzt, filtriert und auf die Reaktion prüft, so kann man sie deutlich nachweisen. Das Absorptionsband liegt dabei rechts von der *D*-Linie. Nach Entfärbung durch Zusatz von Essigsäure auf dem Wasserbade erhitzt, treten bei der Arnoldschen Reaktion keine Blaufärbung oder Niederschläge mehr auf, was bei der Kreatininreaktion der Fall ist, auch geht die violette oder purpurrote Farbe dieser Reaktion auf den frühzeitigen Zusatz von Essigsäure in Blau über.

Alle Oxydationsmittel beeinträchtigen die Reaktion. So wird die Reaktion nach kurzem Einwirken von Bromgas oder Zusatz von einem Tropfen Wasserstoffsuperoxyd ganz negativ. Hingegen befördern alle Reduktionsmittel die Reaktion. Im Vakuum oder H_2- oder CO_2-Raum tritt die Reaktion deutlicher auf und dauert länger an. Besonders ist die Farbenveränderung beim Zinkstaubzusatz sehr interessant. Wenn man dem positiven Harn Zinkstaub zusetzt und dann die Probe anstellt, so zeigt der Harn beim Natronlaugezusatz zwar das gewöhnliche Farbenphänomen, doch entfärbt sich das Gelb bei Essigsäurezusatz nicht, sondern es tritt wieder Purpurrot auf, wie das bei der Probe mit Hydantoin der Fall ist. Indollösung, die durch die alkalische Nitroprussidnatriumlösung eine mit der Arnoldschen Reaktion ähnliche Farbenreaktion zeigt und beim Essigsäurezusatz eine lang persistierende blaue Färbung darbietet, zeigt auch, wenn vorher Zinkstaub der Lösung zugesetzt ist, beim Zusatz von Essigsäure keine blaue Färbung mehr, sondern wieder eine purpurrote. Die Acetonreaktion verliert hingegen durch Zinkstaub ihre purpurrote Färbung, wird rasch gelb, um bald darauf farblos zu werden.

Wird der Harn einige Zeit hindurch aufbewahrt, so büßt die Reaktion nach und nach an Intensität ein (Arnold), um nach 2 bis 3 Wochen vollkommen zu verschwinden. Der Reaktionskörper scheint daher sehr flüchtig zu sein. Um das festzustellen, habe ich verschiedene Versuche gemacht. Zuerst wurde der stark positive Harn unter Ansäuerung mit Salzsäure

sehr lange Zeit hindurch durchlüftet, doch konnte ich keine Abschwächung der Intensität der Reaktion nachweisen. Zweitens habe ich Destillationsversuche unter sehr verschiedenen Umständen (einfache Destillation oder mit dem Zusatze von Alkalien oder Säuren bei verschiedenen Temperaturen [100°, 50°, 38°]) gemacht, um den Reaktionskörper in Wasser, in Essigsäure oder in Metallsalzlösungen (verdünnter Silbernitrat-, Sublimat-, Bleizuckerlösung) aufzufangen, doch wurde niemals eine positive Reaktion im Destillat konstatiert. Ebensowenig glückte es mir bei den Vakuumdestillationen und bei der Destillation im CO_2-Raum, den Arnoldschen Körper im Destillat zu isolieren. Man muß daher wohl annehmen, daß der Arnoldsche Körper absolut nicht destillierbar ist oder beim Verdunsten sich zersetzt. Über die Entwicklung des Schwefels bei der Destillation unter Zusatz von Alkalien und Säuren werde ich unten Genaueres erwähnen.

Einfaches Kochen übt nach Arnold keinen Einfluß auf den Reaktionskörper aus. Wenn man aber den Harn auf dem Wasserbade bis zu dünnem Sirup oder im Vakuum bei 50° bis zur Trockne eindickt, so wird die Reaktion in der Lösung des Rückstandes kaum nachweisbar, während die gewöhnliche Kreatininreaktion konstatierbar bleibt. Wenn der Harn auf dem Wasserbad so lange Zeit hindurch gekocht wird, bis die Arnoldsche Reaktion verschwindet, dann bemerkt man am Boden des Becherglases leicht bräunlich gefärbte, schuppenförmige Niederschläge, die im Gegensatz zu den Phosphaten weder in Wasser noch in Säuren (Essigsäure, Salzsäure) löslich waren. Diese Niederschläge wurden auf dem Filter gesammelt, mehrmals mit destilliertem Wasser ausgewaschen und mit verdünnter Natronlauge gelöst, Bleiessig hinzugefügt und auf die Schwefelbleireaktion geprüft. Es trat jedesmal eine deutliche positive Schwefelreaktion auf. Weil diese Niederschläge bei Hunger- und Nüchternharnen niemals konstatieret werden konnten, veranlaßte mich dies, anzunehmen, daß eine gewisse Schwefelverbindung bei Zersetzung des Arnoldschen Körpers durch langes Kochen entsteht, d. h. daß der Arnoldsche Körper vielleicht eine schwefelhaltige Substanz ist.

Was die Löslichkeit des Arnoldschen Körpers betrifft, so ist er von den gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln nur in

95 %igem Alkohol löslich, in absolutem Alkohol schwer löslich, in Äther, Petroleumäther, Methyl-, Amylalkohol, Chloroform, Benzin, Essigäther unlöslich. Wenn man den Harn im Vakuum bei 35 bis 38° bis zum dünnen Sirup einengt, reichliche Mengen von wasserfreiem Natriumsulfatpulver hinzusetzt, gut mischt, im Vakuumexsiccator trocknet und in wasserfreiem Alkohol löst, so kann man auch darin ziemlich deutlich positive Reaktion nachweisen. Da der Körper in Alkohol löslich ist, so kann man ihn auch durch Schütteln des Harns mit Äthylamylalkoholgemisch (120 zu 180) extrahieren. Doch kann man, direkt geprüft, die Arnoldsche Reaktion darin nicht nachweisen, man muß zuerst dieses Äthylamylalkoholgemisch abdestillieren und den Rückstand in Wasser lösen. Der Arnoldsche Körper wird durch Äther in dem Alkoholextrakt teilweise gefällt, aber die dabei gewonnene Menge ist zu gering, und der Körper selbst in dem Niederschlag ganz unbeständig. Daher ist diese Ätherfällung für die Isolierung dieses Körpers aus dem Harn nicht geeignet.

Die die violette Reaktion gebende Substanz ist dialysierbar, wie ich schon oben erwähnt habe. Wenn man mit der Auszugsflüssigkeit die Arnoldsche Reaktion probiert, so tritt das Farbenphänomen ganz rein auf. Dieses Verfahren ist geeignet, den Körper auch in ganz geringen Mengen nachzuweisen. Wenn man dieses Verfahren gebraucht, so kann man fast in allen Tagesharnen bei der gemischten Nahrung die positive Arnoldsche Reaktion mehr oder minder deutlich nachweisen.

Alkalisiert man eine Harnprobe mit Kali- oder Natronlauge, so erhält man bereits nach sehr kurzer Zeit (d. i. etwa nach 20 bis 30 Sekunden) nur die gewöhnliche Kreatininreaktion (Arnold). Aber die schwachen Alkalien, z. B. Soda, Barytlauge, Ammoniak, Kalkwasser, schädigen sie nicht sofort. In einem Falle, wo der Harn mit Sodalösung schwach alkalisiert war, konnte man nach 1 Stunde die Arnoldsche Reaktion noch positiv nachweisen. Besonders wichtig ist es für die Darstellung des Körpers, daß die Arnoldsche Reaktion nach der Fällung des Harns mit Barytlauge noch ganz schön nachweisbar ist, wenn man aus dem Filtrat schnell durch CO_2 den Überschuß des Bariums entfernt. In Bouillon ist der Arnoldsche Körper gegen Alkalien viel resistenter als im Harn.

Während der Arnoldsche Körper gegen Alkalien sehr empfindlich ist, ist er gegen Säuren relativ widerstandsfähig. Verdünnte Mineralsäuren schädigen die Reaktion nicht sofort; der mit $^{1}/_{3}$ Volumen $20^{0}/_{0}$iger Salzsäure versetzte Harn zeigt nach $^{1}/_{4}$ stündigem Kochen auf dem Wasserbade noch die positive Arnoldsche Reaktion, während man bei Zusatz von Essigsäure noch länger (1 Stunde) kochen kann, ohne daß die Farbenreaktion verschwindet.

Der Arnoldsche Körper wird durch salzsäurehaltige Phosphorwolframsäure nicht gefällt; wenn man das Filtrat mit Barytwasser überneutralisiert und sofort durch CO_2-Einleitung vom Überschuß des Bariums befreit und abfiltriert, so zeigt das letztere Filtrat noch ziemliche deutlich positive Reaktion. Ebenso fällen Gerbsäure, Weinsäure, Pikrinsäure nicht, nur durch ätherische Oxalsäure wird der Körper aus dem alkoholischen Extrakt zusammen mit Harnstoff teilweise gefällt.

Beim Kochen des positiven Harns mit Mineralsäure entwickelt sich auch Schwefelwasserstoff sehr deutlich, und zwar augenscheinlich viel stärker als bei den normalen Harnen, ein Befund, der weiter unten im Zusammenhang mit anderen Tatsachen berücksichtigt werden soll.

Neutralsalze, wie NaCl, Na_2SO_4 usw., beeinträchtigen die Arnoldsche Reaktion nicht. Aber einige Salze, wie Ammonsulfat (Arnold), Magnesiumsulfat, Chlorgold, Sublimat usw., hindern das Auftreten der Arnoldschen Reaktion. Die Reaktion ist nämlich erst nach der Entfernung des Salzes durch Alkohol (Sulfate) oder Zinkstaub (Gold, Sublimat) nachweisbar.

Der Arnoldsche Körper wird von den gewöhnlichen Metallsalzen (Gold-, Silber-, Blei-, Zink-, Kupfer-, Wismut-, Alkali- und Erdalkalisalzen) nicht gefällt. Immerhin gelang es mir ihn unlöslich zu machen, und zwar auf folgenden Wegen. Wenn man den Harn nach dem Verfahren für die Aufteilungsbestimmung des Harnstickstoffs von E. Freund und R. Fellner[1]) behandelt und mit Sublimat und Soda (oder Barytlauge) den Harnstoff fällt, so wird der Körper mit dem Harnstoff usw. mitgefällt; wird der Niederschlag auf dem Filter gesammelt, mit Zink und Eisessig (oder Salzsäure) im Mörser tüchtig zerrieben oder nach

[1]) E. Freund und R. Fellner, Zeitschr. f. physiol. Chem. **36**, 401, 1902.

der Ansäuerung mit H_2S zersetzt und durch Durchlüftung der H_2S entfernt, so läßt das Filtrat noch die positive Reaktion nachweisen. Das zweite Fällungsmittel ist Mercurinitrat. Wenn man den Harn mit gesättigter Lösung dieses Quecksilberpräparats behandelt und den Niederschlag mit H_2S zerlegt und den H_2S dann vollständig verjagt, so kann man in der Flüssigkeit noch die Arnoldsche Reaktion nachweisen. Drittens wird der Körper im Alkoholextrakt des Harns nach dem Verfahren der Harnstoffbestimmung von E. Freund und Töpfer durch ätherische Oxalsäure mit dem Harnstoff teilweise gefällt. Der Niederschlag ist in Wasser und Alkohol löslich und zeigt die typische Violettreaktion.

V. Identifizierungsversuch.

Von den bisher aus dem Harn dargestellten Körpern geben nur wenige Substanzen eine mit der Arnoldschen Reaktion ähnliche Farbenreaktion gegen Nitroprussidnatrium und Lauge. V. Arnold hatte schon in seiner ersten Publikation diese eigentümliche violette Reaktion von den bei Kreatinin, Aceton, Ammonsalzen (Chlorammon, schwefelsaures Ammon, kohlensaures Ammon, essigsaures, milchsaures Ammon, Rhodanammon u. a.), Cystin, Methylmercaptan und Indol beobachteten ähnlichen Reaktionen unterschieden. Nicht nur in bezug auf die Farbe, sondern auch analytisch können wir den Arnoldschen Körper von den oben genannten Substanzen trennen, weil er durch Sublimat-Natriumacetat, durch alkoholische Zinkchloridlösung oder durch Phosphorwolframsäure usw. nicht fällbar (Kreatinin) und nicht destillierbar ist (Aceton, Indol, Schwefelwasserstoff, Mercaptan) und nur in frischem, unzersetztem Harn konstatierbar ist (Ammonsalze) und durch Salzsäure und Quecksilberchlorid gar nicht gefällt wird (Cystein).

Von nicht im Harn vorkommenden Substanzen erhält man dagegen nach Guareschi[1]) die Probe mit Acetessigäther und solchen Körpern, die wie das Kreatinin 2 Atome N, an die Gruppe $CH_2.CO$ gebunden, enthalten, also Hydantoin (das eigentliche Hydantoin, Thiohydantoin, Methylhydantoin, Alaninhydantoin). Weil aber nach meinen Untersuchungen die oben ge-

[1]) T. Guareschi, Ann. di chim. e di farmacoli 4, 5, 195; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. Ref. 21, 372, 1888.

nannten Acetessigäther und Hydantoinverbindungen (diese geben nur die purpurrote, nicht die reine violette Färbung) eine nicht ganz gleiche Reaktion mit der Arnoldschen Reaktion geben, so ist die der Arnoldschen Reaktion zugrunde liegende Substanz nach der jetzigen Kenntnis mit keiner anderen Substanz, die ähnliche Reaktion gibt, identisch. Mir schien es vor allem wichtig, zu konstatieren, ob der Arnoldsche Körper Schwefel enthält.

Prüfung auf Schwefel.

I. Um zu sehen, ob in den Urinen, die die Arnoldsche Reaktion geben, Schwefel reichlicher enthalten ist als in den anderen Urinen, wurden verschiedene Harne nativ und mit HCl versetzt destilliert und das Destillat auf das Vorhandensein von SH_2 (Schwärzung von Bleipapier durch die entweichenden Dämpfe) untersucht. In anderen Harnportionen wurde nach Kochen mit Lauge und nach vorhergehender Oxydation durch Brom nach dem Auftreten von bleischwärzendem Schwefel gefahndet. Die folgende Tabelle zeigt die ermittelten Resultate.

Tabelle VI.

	Einfache Destillation	Destillation mit HCl	Kochen mit Lauge	Dem Harn Bromgas zugesetzt
	Bleipapierprobe	Bleipapierprobe	Bleischw.	Bleipapierprobe
1. Nüchternharn (A. R. 0)	0	+	0	+
2. Tagesharn, gem. Kost (A. R. 0) .	0	+	0	+
3. Schwach positiv. Harn (A. R. +) .	0	++	+	+
4. Stark positiver Harn (A. R. ++)	0	+++	++	++
5. Zuckerharn mit Aceton (A. R. ±)	0	+	±	+
6. Zuckerharn mit Eiweiß (A. R. 0)	0	+	+	+
7. Zuckerharn mit Aceton (A. R. +)	0	+	+	+

Hieraus ist klar ersichtlich, daß im Arnold-positiven Harn eine Schwefelverbindung reichlicher enthalten ist, die durch

Säure oder durch Alkali leicht Schwefelwasserstoff entwickelt. Da dieser Befund nur bei den Urinen, die die Arnoldsche Reaktion zeigen, vorhanden ist, war dies die Veranlassung für mich zu glauben, daß die die Reaktion gebende Substanz eine Schwefelverbindung sei. Damit stimmt auch die Tatsache überein, daß eine eigentümliche schwefelhaltige Verbindung beim langen Kochen des Harns — als ein, wie schon erwähnt, in Wasser und Säure unlöslicher Niederschlag — entsteht.

II. Dann wurde der Neutralschwefelgehalt in verschiedenen Urinen verglichen. Denn die Arnoldsche Substanz, wenn sie wirklich schwefelhaltig wäre, muß zu den Verbindungen des sog. Neutralschwefels, und zwar des leicht abspaltbaren Neutralschwefels gehören. Es wurde daher jeder Urin mit Bariumchlorid und mit Salzsäure $^1/_4$ Stunde (oder mit Essigsäure $^1/_2$ Stunde) auf dem Wasserbad gekocht, abfiltriert, um den ganzen Schwefel der Sulfate und der Ätherschwefelsäure zu entfernen, und dieses Filtrat in der gleichen Weise wie oben der native Harn auf Schwefel geprüft.

Tabelle VII.

	Destillat mit HCl	Kochen mit Lauge	Nach der Oxydation mit HNO_3 od. $KClO_3$
	Bleipapierprobe	Bleischwärzung	Bariumniederschlag
1. Nüchternharn (A. R. 0)	+	0	+
2. Tagesharn (A. R. 0) .	+	0	++
3. Zwiebelharn (A. R. +)	++	+	+++
4. Bratenharn (A. R. ++)	+++	++	+++

Aus der Tabelle kann man ersehen, daß in den Verdauungsharnen reichlichere Mengen von Neutralschwefel als in anderen Harnen enthalten sind. Die Menge des Niederschlages von Neutralschwefelbarium scheint auch der Intensität der Arnoldschen Reaktion ganz parallel aufzutreten.

Um zu untersuchen, ob dieser Neutralschwefel wirklich mit dem Arnoldschen Körper einen Zusammenhang hat, wurde der positive Harn in zwei Portionen geteilt, die eine Portion davon durch Kochen von der Arnoldschen Reaktion befreit und nun in beiden Portionen wie oben die Menge des Neutralschwefels bestimmt.

Es zeigte sich, daß der Gehalt des Neutralschwefels in der Harnportion, in der die Arnoldsche Reaktion durch langes

Kochen zerstört wurde, deutlich geringer war als im Urin; das macht es wahrscheinlich, wenn auch wohl nicht gewiß, daß die Zersetzung des Arnoldschen Körpers auf Schwefelabspaltung zurückzuführen ist.

III. Andererseits wurden auch zum Nachweis des Schwefels im Arnoldschen Körper die folgenden Versuche gemacht und in allen Fällen deutliche Schwefelreaktion nachgewiesen, wenn es sich um positive Harne handelte, während dies in den untersuchten negativen Urinen nicht der Fall war.

a) Es wurde das Filtrat nach der Fällung mit Phosphorwolframsäure mit Barytlauge überneutralisiert und sofort mit Kohlensäure der Überschuß des Barytsalzes entfernt. Dieses Filtrat zeigt noch die positive Arnoldsche Reaktion und auch Schwefelbleireaktion. Ich habe diese Flüssigkeit mit Salzsäure oder Kalilauge versetzt, im Vakuum unter geringer Wärme destilliert und das Destillat in 3%iger $AgNO_3$-Lösung aufgefangen. Dabei traten im Destillatkolben reichliche schwarze Niederschläge auf, die nur in Cyankalilösung leicht löslich sind (Silbersulfid).

b) Ein gleiches Resultat habe ich bei dem Extrakt des Harns mit wasserfreiem Alkohol, der mit Bleisubacetat gefällt und mit CO_2 entbleit wurde, erhalten.

c) Schließlich habe ich den Alkoholextrakt des Harns mit oxalsaurem Äther behandelt und die dabei entstandenen Niederschläge mit Alkoholäther mehrmals ausgewaschen, in Wasser oder Alkohol gelöst. Die Lösung, die noch die Arnoldsche Reaktion gibt, wird auf die gleiche Weise destilliert. Dann traten ebenfalls schwarze Niederschläge in der Silberflüssigkeit ein, die auch in Kaliumcyanatlösung leicht löslich waren.

d) Wurde der alkoholische Extrakt mit Äther gefällt, der Niederschlag mehrmals mit Alkoholäther ausgewaschen und dann im Zentrifugierglas noch mehrmals mit Amylalkohol gewaschen und wieder in Wasser gelöst, Kalilauge und Bleizucker hinzugesetzt und auf dem Wasserbad gekocht, so trat auch die Schwefelbleireaktion auf.

Wie man schon aus diesen Resultaten ersehen kann, ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem die Arnoldsche Reaktion im Harn hervorrufenden Körper um eine organische Schwefelverbindung, und zwar eine Verbindung, die leicht abspaltbaren Neutralschwefel in sich hat, handelt.

Unter normalen Verhältnissen sind als schwefelhaltige Verbindungen im Harn Schwefelwasserstoff, Sulfate, Ätherschwefelsäure, Rhodanwasserstoff, Mercaptan, Diäthylsulfid, Diäthylmethylsulfinbase, Proteinsäure (Antoxy-, Oxy-, Alloxyproteinsäure) und Abkömmlinge des Cystins und Taurins bekannt. Einige von diesen geben zwar die gleiche Farbenreaktion mit Nitroprussidnatrium und Alkali, wie die Arnoldsche Reaktion (Schwefelwasserstoff, Mercaptan, Diäthylsulfid, Cystein), sind aber in bezug auf andere chemische Eigenschaften vollkommen verschieden, wie ich schon oben erwähnt habe.

Aber andererseits hat der Arnoldsche Körper in sehr vielen Punkten mit dem Harnstoff übereinstimmende Eigenschaften, wie ich schon oben erwähnt habe, während er keine dem Kreatinin ähnliche Eigenschaften zeigt. Besonders, daß der Körper durch Phosphorwolframsäure und Barytalkoholäther nicht fällbar, durch alkalisches Sublimat, Quecksilberoxydnitrat, oxalsauren Äther fällbar ist, veranlaßt mich der Ansicht Ausdruck zu geben, daß es sich beim Arnoldschen Körper um eine dem Harnstoff nahestehende Substanz oder um eine Vorstufe — im Gegensatz zu der Ansicht von V. Arnold, der die Substanz als eine Vorstufe des Kreatinins deutete — handle.

Von dieser Ansicht ausgehend, habe ich bei verschiedenen Schwefelderivaten des Harnstoffes die Farbenreaktion mit Nitroprussidnatriumlösung und Kali- oder Natronlauge geprüft. Obgleich über die im Harn vorkommenden Harnstoffderivate schon von Folin[1]) (über Methylharnstoff) und von Jaffé[2]) (über Äthylharnstoff) gearbeitet wurde, ist doch über die Schwefelderivate des Harnstoffes diesbezüglich noch gar nichts bekannt. Es wurden daher nun viele Präparate möglichst rein dargestellt und auf ihre Farbenreaktion und ihre chemischen Eigenschaften geprüft. (Thioharnstoff, trichlormethylsulfinsaurer Thioharnstoff, Thioharnstofftrichlormethylsulfinyl, Methylthioharnstoff, Äthylthioharnstoff, Allylthioharnstoff, Äthylenthioharnstoff, Allylformamidindisulfid, Thiohydantoin, Glykolylthioharnstoff, Isothiohydantoin). Die meisten oben genannten Präparate haben dem Arnoldschen Körper ähnliche physikalische Eigenschaften,

[1]) Folin, Journ. of Biolog. Chem. 3, 83, 1907.

[2]) Jaffé, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 537, 1897.

und einige davon zeigen auch bei der Probe mit Nitroprussidlösung und Lauge eine der Arnoldschen Reaktion ähnliche Farbenreaktion, die aber, genauer betrachtet, nicht ganz identisch ist; die violette Färbung dauert nur ganz kurze Zeit oder fehlt vollständig.

Was andererseits aber Vorstufen des Harnstoffes anbetrifft, so kommen in unseren Fällen Thioamidverbindungen zuerst in Betracht. Wirklich zeigen nun einige Verbindungen der Thioamide bei der Probe mit alkalischer Nitroprussidnatriumlösung eine mit der Arnoldschen Reaktion ähnliche Färbung (Carbaminthiosäure und Derivate usw.). Bevor aber die ganze Reihe von sehr vielen Verbindungen dieser Gruppe auf die Arnoldsche Reaktion geprüft wurde, wurden zuerst folgende Versuche gemacht.

Es ist bekannt, daß Thioamide durch Kochen mit alkoholischen Alkalien oder verdünnten Säuren in ihre Komponenten, und zwar zum Teil in Rhodanwasserstoff gespalten werden. Wenn daher die der Arnoldschen Reaktion zugrunde liegende Substanz wirklich eine solche Thioamidverbindung ist, wäre zu erwarten, daß der die Arnoldsche Reaktion gebende Harn oder die von den übrigen Substanzen relativ rein isolierte Substanz bei der Behandlung mit alkoholischem Alkali oder Säure eine Rhodanverbindung abspalten wird.

Was das gewöhnliche Rhodan anbelangt, so kann man es in jedem Harn mit oder ohne Arnoldsche Reaktion mehr oder minder nachweisen, wenn man die Sulfate mit Barytwasser entfernt hat. Aber diese gewöhnlichen, schon als solche im Harn vorhandenen Rhodanverbindungen sind für unsere Fälle ohne Belang, wir wollen nur wissen, ob außer diesen gewöhnlichen Rhodanverbindungen noch eine Substanz, die durch Kochen mit Alkalien oder Säuren usw. erst in die Rhodanverbindungen verwandelt wird, im Harn mit positiver Arnoldscher Reaktion vorhanden ist.

Weil die die Arnoldsche Reaktion auslösende Substanz durch Silbernitratlösung oder Phosphorwolframsäure nicht fällbar ist, während die im Harn als solche schon vorhandenen Rhodanverbindungen durch diese Reagenzien vollständig fällbar sind, so ist es durch diese Reagenzien möglich, die beiden Substanzen voneinander zu trennen.

a) Es wurden nach J. Munk[1]) 200 ccm Harn mit deutlich positiver Arnoldscher Reaktion mit salpetersaurem Silber ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat, das die Arnoldsche Reaktion noch deutlich zeigte, wird mit gesättigter Kochsalzlösung vollständig entsilbert; das Filtrat bei niedriger Temperatur im Vakuum zur Sirupkonsistenz eingedampft, der Rückstand mit Alkohol ausgezogen, der Alkohol verdunstet und der Rückstand in Wasser gelöst. Diese Lösung, die noch schwache Arnoldsche Reaktion zeigte, mit Salzsäure und Eisenchlorid behandelt, zeigte immer nur gelbliche Färbung. Fügt man aber einige Kubikzentimeter Salzsäure oder alkoholische Kalilauge zu der wässerigen Lösung hinzu und kocht auf dem Wasserbade kurze Zeit, entfärbt die Lösung mit Tierkohle — beim Gebrauch von Alkali wird zuerst mit Salzsäure angesäuert — und versetzt diese Lösung mit einigen Tropfen verdünnter Eisenchloridlösung, so tritt beim Verdauungsharn immer eine rotbräunliche Färbung ein, die beim Kochen stets stärker wird und bei Zusatz von Salzsäure nicht verschwindet. Bei gewöhnlichen Tagesharnen ohne die Arnoldsche Reaktion tritt in der Regel nur eine gelbliche oder gelbbräunliche Färbung ein.

b) Bringt man in den entsilberten Harn der obigen Probe einige Stückchen metallisches Zink, fügt Salzsäure hinzu und hält in die Mündung des Gefäßes einen mit essigsaurem Blei und Ammoniak benetzten Streifen Filtrierpapier, so wird derselbe bei positiven Harnen geschwärzt, was bei negativen Urinen absolut nicht der Fall ist.

c) Endlich wurde die entsilberte Flüssigkeit mit alkoholischem Barythydrat alkalisch gemacht und der Destillation unterworfen. Das Destillat wird mit einer eisenoxydhaltigen Eisenvitriollösung versetzt, mit Kali- oder Natronlauge alkalisch gemacht, samt dem entstandenen Niederschlag gelinde erwärmt und mit Salzsäure angesäuert. Bei den Urinen mit positiver Arnoldscher Reaktion sieht man in der zuletzt erhaltenen Lösung eine grünliche Färbung. Bei den gewöhnlichen Urinen ist das niemals der Fall.

Ganz dieselben Befunde konnte ich auch erheben, wenn ich nicht mit nativem Urin arbeitete, sondern mit dem Filtrat nach Phosphorwolframsäurefällung.

[1]) J. Munk, Virchows Archiv 69, 351 und 358, 1877.

Auch bei der Lösung des relativ rein isolierten Arnoldschen Körpers konnte ich das gleiche Verhalten konstatieren. Wurde der positive Harn im Vakuum bei 35 bis 38° eingeengt, mit wasserfreiem Alkohol extrahiert und mit oxalsaurem Äther gefällt, der Niederschlag in Wasser gelöst (die Arnoldsche Reaktion schwach positiv) mit Salzsäure und Eisenchlorid versetzt, so trat keine rote Färbung auf, während nach dem Kochen mit Salzsäure oder Kalilauge durch Eisenchlorid eine schöne rotbräunliche Färbung auftrat.

Nach diesen Befunden scheint es fast sichergestellt, daß in Harnen mit positiver Arnoldscher Reaktion sozusagen ein „Neutralrhodan" enthalten ist, das anders als das gewöhnliche Rhodan als solches nicht vorgebildet ist, sondern erst durch Alkali oder Säure aus seiner Muttersubstanz abgespalten wird. Diese Muttersubstanz wäre vielleicht der die Arnoldsche Reaktion hervorrufende Körper.

Unter den Thioamiden muß zuerst an die Schwefelverbindungen der Carbaminsäure gedacht werden. Ich habe daher einige Präparate davon möglichst rein dargestellt und auf die Farbenreaktion gegen Nitroprussidnatrium und Lauge geprüft. Es wurde Carbaminthiolsäuremethyl-, -äthyl-, -isomethylester, Carbaminthioglykolsäure, Carbaminthionsäuremethyl-, -äthyl-, -oxysulfocyanester, Äthylthiocarbaminsäureäthylester untersucht. Einige Verbindungen zeigten mit der Arnoldschen Reaktion ganz ähnliche Farbenphänomene, während ihre sonstigen chemischen Eigenschaften, besonders das Verhalten gegenüber Metallsalzen und Phosphorwolframsäure, mit dem Arnoldschen Körper nicht ganz übereinstimmten, so daß ich leider noch nicht bestimmen kann, ob eine Verbindung der Thioamide mit dem Arnoldschen Körper völlig übereinstimmt. Doch sind noch sehr viele Verbindungen von Thioamiden bekannt, die dem sog. Arnoldschen Körper nahestehende Lösungseigenschaften haben, aber auf die Nitroprussidreaktion noch nicht geprüft werden konnten; unter diesen könnte sich ja eine Verbindung mit völlig gleichen Eigenschaften finden.

Zusammenfassung.

1. Es wurde die sog. Arnoldsche Reaktion im Harn bei Menschen, Fleischfressern, Pflanzenfressern und Geflügel unter-

sucht. Bei den Säugetieren fehlt sie im Nüchtern- oder Hungerzustande vollständig, tritt hingegen nach Genuß verschiedenartigster Nahrung auf. Besonders intensiv ist die Reaktion nach dem Genuß von Fleischspeisen, während sie nach der Einverleibung von anderen Nahrungsmitteln nur ganz schwach nachzuweisen ist. Beim Geflügelharn fehlt diese Reaktion unter allen Umständen.

2. Die violette Nitroprussidreaktion kann man nicht nur im Harn, sondern auch in der frischen Fleischbouillon oder in dem Fleischextrakt und auch in dem Extrakt gewisser Körperorgane nachweisen. Diese die violette Reaktion gebenden Substanzen in Muskel- und in Organextrakten zeigen die gleichen chemischen Reaktionen.

3. Die Substanz im Harn stammt teils von den mit Nahrung aufgenommenen Körpern her, teils wird sie aber als ein endogenes Stoffwechselprodukt in den Harn ausgeschieden. Für die endogene Entstehung scheint die Zellfunktion der Verdauungsorgane eine gewisse Rolle zu spielen.

4. Die Hauptnährstoffe: Eiweiß, Kohlenhydrate und Fette in reinen Formen haben mit der Entstehung und Ausscheidung dieser Substanz im Organismus keinen direkten Zusammenhang. Psychischer Einfluß ist auch auszuschließen.

5. Es fand sich kein Krankheitsprozeß, der die sog. Arnoldsche Reaktion im Harn verursacht.

6. Diese Substanz ist mit 3 Fällungsmitteln des Harnstoffes (Sublimat und Alkali, Quecksilberoxydnitrat, ätherischer Oxalsäurelösung) fällbar.

7. Keiner der bisher bekannten Harnbestandteile gibt diese Reaktion.

8. Es ist höchstwahrscheinlich, daß diese Substanz eine organische Schwefelverbindung ist.

9. In den die Arnoldsche Reaktion gebenden Urinen ist außer den gewöhnlichen Rhodanverbindungen noch ein Körper vorhanden, aus dem durch Kochen mit Säure oder Alkali Rhodan abgespalten wird.

10. Bei der der Arnoldschen Reaktion zugrunde liegenden Substanz handelt es sich wahrscheinlich um eine Thioamidverbindung, die durch Kochen mit Säure oder Alkali Rhodan resp. Schwefelwasserstoff abzuspalten imstande ist.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

XXI. Mitteilung.

Weitere Versuche über die Bildung von l-β-Oxybuttersäure aus Crotonsäure durch Leberbrei.

Von

E. Friedmann.

(Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik der Kgl. Charité zu Berlin.)

(Eingegangen am 10. März 1914.)

In Versuchen, die ich gemeinschaftlich mit C. Maase[1]) ausgeführt habe, habe ich zeigen können, daß Leberbrei Crotonsäure in l-β-Oxybuttersäure überzuführen vermag. So nahe es auch liegt, diese Reaktion als Wasseranlagerung an Crotonsäure aufzufassen, so haben die bisher nach dieser Richtung ausgeführten Versuche keine entscheidenden Anhaltspunkte für die Richtigkeit dieser Vorstellung gegeben.

Zwar konnte nachgewiesen werden, daß bei der Digestion von Leberbrei mit Crotonsäure auch bei Abwesenheit von Blut und überschüssigem Sauerstoff aus Crotonsäure l-β-Oxybuttersäure erhalten wird, als aber versucht wurde, den Sauerstoff vollständig aus dem Digestionsgemisch durch Einleiten von Kohlensäure zu vertreiben, blieb die Bildung von l-β-Oxybuttersäure aus Crotonsäure vollständig aus.

Es lag nahe, dieses Ausbleiben der Bildung von l-β-Oxybuttersäure aus Crotonsäure in dem mit Kohlensäure gesättigten Digestionsgemisch auf eine Wirkung der Kohlensäure zurückzuführen. Ich prüfte daher, ob indifferente Gase sich ähnlich wie die Kohlensäure verhielten, und untersuchte das Verhalten des Wasserstoffs und des Stickstoffs bei der Digestion von Leberbrei mit Crotonsäure.

---

[1]) E. Friedmann und C. Maase, diese Zeitschr. 55, 450, 1913.

Digestion von Leberbrei mit Crotonsäure unter Einleiten von Wasserstoff.

Die Versuchsanordnung war die gleiche, wie sie in den Versuchen, die ich mit C. Maase ausgeführt habe, geschildert worden ist.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Digestionsgemisch	Dauer der Digestion Std.	Drehung des Ätherextraktes	Menge der gebildeten l-β-Oxybuttersäure mg	Bemerkungen
1	50 g Leberbrei 150 ccm physiol. NaCl-Lösung	6	0	—	Hund I
2	50 g Leberbrei 100 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	— 0,04	20,7	Hund I
3	50 g Leberbrei 100 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	0	—	Hund I Wasserstoff eingeleitet
4	47 g Leberbrei 150 ccm physiol. NaCl-Lösung	6	+ 0,05	—	Hund II
5	50 g Leberbrei 100 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	0	—	Hund II
6	50 g Leberbrei 100 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	+ 0,07	—	Hund II Wasserstoff eingeleitet
7	50 g Leberbrei 150 ccm physiol. NaCl-Lösung	6	0	—	Hund III
8	50 g Leberbrei 100 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	— 0,11	57,0	Hund III
9	50 g Leberbrei 100 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	0	—	Hund III Wasserstoff eingeleitet

Mit den Lebern der Versuchstiere wurden jedesmal drei Parallelversuche ausgeführt. In dem ersten Versuche wurde der Leberbrei ohne Zusatz von Crotonsäure zur Digestion angesetzt, im zweiten Versuche unter Zusatz von Crotonsäure, und im dritten Versuche unter Zusatz von Crotonsäure und Einleiten von Wasserstoff. Die hierbei erhaltenen Resultate sind in der Tabelle I zusammengestellt (S. 282).

Aus den Versuchen der Tabelle I geht hervor, daß Einleiten von Wasserstoff genügt, um die Fähigkeit des Leberbreies, Crotonsäure in l-β-Oxybuttersäure umzuwandeln, aufzuheben.

Digestion von Leberbrei mit Crotonsäure unter Einleiten von Stickstoff.

Die Versuche, in denen ich Leberbrei mit Crotonsäure unter Einleiten von Stickstoff digeriert habe, wurden in derselben Weise angesetzt wie die Digestionsversuche unter Einleiten von Wasserstoff. Über die unter Einleiten von Stickstoff in das Digestionsgemisch von Leberbrei mit Crotonsäure erhaltenen Resultate berichtet die umstehende Tabelle II.

Die Versuche der Tabelle II zeigen, daß beim Einleiten von Stickstoff in das Digestionsgemisch von Leberbrei und Crotonsäure die Bildung von l-β-Oxybuttersäure aus Crotonsäure vollständig aufgehoben ist. Wasserstoff, Stickstoff und Kohlensäure üben daher die gleiche Wirkung aus.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß es genügt, den Sauerstoff aus dem Digestionsgemisch zu verdrängen, um die Bildung von l-β-Oxybuttersäure aus Crotonsäure durch Leberbrei aufzuheben. Die Deutung dieser Beobachtungen dürfte wohl darin zu suchen sein, daß zum Zustandekommen der Bildung von l-β-Oxybuttersäure aus Crotonsäure im Leberbreiversuch die Anwesenheit von Sauerstoff notwendig ist.

Zur Erklärung der Rolle des Sauerstoffs für diese Reaktion kämen zwei Möglichkeiten in Betracht. Einmal könnte man sich vorstellen, daß der Sauerstoff direkt in die Reaktion in der Weise eingreift, daß aus Crotonsäure zuerst ein sauerstoffhaltiges Zwischenprodukt gebildet wird, das weiter zu l-β-Oxybuttersäure umgewandelt wird, oder der Sauerstoff könnte sich

indirekt an der Reaktion beteiligen, indem sein Vorhandensein Vorbedingung für die Wirksamkeit der hier in Betracht kommenden Faktoren ist.

Tabelle II.

Versuchs-Nr.	Digestionsgemisch	Dauer der Digestion Std.	Drehung des Ätherextraktes	Menge der gebildeten l-β-Oxybuttersäure mg	Bemerkungen
10	60 g Leberbrei 180 ccm physiol. NaCl-Lösung	6	0	0	Hund IV
11	60 g Leberbrei 130 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung { 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	— 0,05	25,9	Hund IV
12	60 g Leberbrei 130 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung { 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	0	0	Hund IV Stickstoff eingeleitet
13	50 g Leberbrei 150 ccm physiol. NaCl-Lösung	6	+ 0,01	—	Hund V
14	50 g Leberbrei 100 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung { 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	— 0,05	31,1	Hund V
15	50 g Leberbrei 100 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung { 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	+ 0,01	—	Hund V Stickstoff eingeleitet
16	50 g Leberbrei 150 ccm physiol. NaCl-Lösung	6	+ 0,01	0	Hund VI
17	50 g Leberbrei 100 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung { 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	— 0,04	25,9	Hund VI
18	50 g Leberbrei 100 ccm physiol. NaCl-Lösung {50 ccm physiol. NaCl-Lösung { 1 g Crotonsäure mit Natronlauge neutralisiert	6	+ 0,01	0	Hund VI Stickstoff eingeleitet

Gegen eine direkte Beteiligung des Sauerstoffs an der Reaktion spricht vielleicht der Umstand, daß die Zufuhr von über-

schüssigem Sauerstoff, selbst bei Anwesenheit von Blut, nach den Versuchen, die ich mit C. Maase ausgeführt habe, zu keinen höheren Werten für die gebildete l-β-Oxybuttersäure führt als die Digestion von Leberbrei bei Abwesenheit von Blut und überschüssigem Sauerstoff. Entscheidend sind die erwähnten Experimente für die aufgeworfene Frage jedoch nicht, und es wird weiterer Versuche bedürfen, um die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Rolle des Sauerstoffs bei der Überführung von Crotonsäure in l-β-Oxybuttersäure durch Leberbrei aufzuklären.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

XXII. Mitteilung.

Verhalten der Glykolsäure bei der Leberdurchblutung.

Von

Kensaburo Honjio.

(Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik der Kgl. Charité zu Berlin.)

(Eingegangen am 10. März 1914.)

J. Mochizuki[1]) hat vor kurzem über Versuche berichtet, die auf Veranlassung und unter Leitung von E. Friedmann ausgeführt waren, und die zur Aufgabe hatten, den chemischen Mechanismus der von Adam Loeb[2]) im Laboratorium von Gustav Emden beobachteten Bildung von Acetessigsäure aus Essigsäure bei der Leberdurchblutung näherzukommen. Mochizuki prüfte zu diesem Zwecke die Oxydationsprodukte der Essigsäure, die Glykolsäure und die Glyoxylsäure, auf ihre Fähigkeit, im Durchströmungsversuche die Größe der Acetessigsäurebildung zu beeinflussen. Er kam zu dem Ergebnis, daß weder die Glykolsäure noch die Glyoxylsäure den Umfang und die Größe der Acetessigsäurebildung in der überlebenden Leber zu steigern vermögen.

Die Richtigkeit dieser Feststellung ist bezüglich der Glykolsäure von Emden und Loeb[3]) bestritten worden. Diese Forscher teilen 6 Durchströmungsversuche mit Glykolsäure als Zusatz zur Durchströmungsflüssigkeit mit, von denen nach ihrer

---

[1]) Junichi Mochizuki, diese Zeitschr. 55, 443, 1913.

[2]) Adam Loeb, diese Zeitschr. 46, 118, 1912.

[3]) Gustav Embden und Adam Loeb, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 246, 1913.

Ansicht 5 Versuche eine deutliche Steigerung der Acetessigsäurebildung aufweisen (Versuche 30 bis 34), während ein Versuch einen hohen Normalwert liefert (Versuch 29). Als auffällig bezeichnen sie es, daß gerade im letztgenannten Versuch ebenso wie in sämtlichen Versuchen **Mochizukis** die Neutralisation der Glykolsäure mit Natronlauge erfolgte, während in 'hren 5 positiv ausgefallenen Versuchen Ammoniak als Neulisationsmittel verwandt wurde. Sie heben jedoch hervor, 8 sie allerdings bisher niemals eine Wirkung des Neutralitionsmittels auf den Umfang der Acetessigsäurebildung beɔachtet haben.

Bei dieser Differenz in den Resultaten **Mochizukis** einerseits und **Emden** und **Loebs** andererseits schien es wünschenswert, von neuem Durchströmungsversuche mit Glykolsäure anzustellen, und dies um so mehr, als auch die chemische Deutung, die **Emden** und **Loeb** für ihre Versuche in Erwägung ziehen, nach der der Weg der Glykolsäure zur Acetessigsäure über die Essigsäure führt, erhebliches Interesse beansprucht.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Gewicht des Hundes g	Gewicht der Leber g	Durchblutungsflüssigkeit	Durchblutungs- Zeit Min.	Durchblutungs- Zahl	Druck mm Hg	Temperatur des Blutes °C	Menge d. pro Liter Durchblutungsblut neugebildeten Acetons mg
1	7200	213	1400 ccm Rinderblut; 2 g Glykolsäure mit Natronlauge neutralisiert; 100 ccm physiol. NaCl-Lösung	72	11	18—32	35—36	39,9
2	7300	165	1400 ccm Rinderblut; 2 g Glykolsäure mit Natronlauge neutralisiert; 100 ccm physiol. NaCl-Lösung	76	10	16—26	37	45,3
3	4000	148	1400 ccm Rinderblut; 2 g Glykolsäure mit Natronlauge neutralisiert; 100 ccm physiol. NaCl-Lösung	80	5	38—50	35—37	16,6

Ich habe daher auf Veranlassung von Herrn Prof. E. Friedmann die Versuche von Mochizuki wieder aufgenommen und prüfte im Durchströmungsversuche sowohl glykolsaures Natrium wie glykolsaures Ammonium auf ihre Fähigkeit, die Größe der Acetessigsäurebildung in der überlebenden Leber zu beeinflussen. Die Technik der Versuche war die von Mochizuki eingehaltene. Ebenso wie Mochizuki verwendete ich für diese Versuche die Lebern von Hunden, die 24 Stunden gehungert hatten.

Die Resultate, die ich bei Zusatz von glykolsaurem Natrium erhalten habe, sind in Tabelle I niedergelegt.

Wie die Tabelle I zeigt, vermag Zusatz von glykolsaurem Natrium zum Durchblutungsblute die Größe der Acetessigsäurebildung in der überlebenden Leber nicht in einer Weise zu beeinflussen, die zu dem Schlusse berechtigen würde, daß die Glykolsäure als Natriumsalz das Material der neugebildeten Acetessigsäure liefert. Selbst der höchste von mir beobachtete

Tabelle II.

Versuchs-Nr.	Durchblutungsflüssigkeit	Gewicht der Leber g	Durchblutungszeit Minuten	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons mg
1	1400 ccm Rinderblut 2 g Glykolsäure mit Natronlauge neutralisiert 100 ccm physiol. NaCl-Lösung	115,5	86	40,6
2	1400 ccm Rinderblut 2 g Glykolsäure mit Natronlauge neutralisiert 100 ccm physiol. NaCl-Lösung	110,0	82	21,5
3	1400 ccm Rinderblut 2 g Glykolsäure mit Natronlauge neutralisiert 100 ccm physiol. NaCl-Lösung	250,0	76	27,3
4	1400 ccm Rinderblut 2 g Glykolsäure mit Natronlauge neutralisiert 100 ccm physiol. NaCl-Lösung	143,7	88	41,1
5	1400 ccm Rinderblut 2 g Glykolsäure mit Natronlauge neutralisiert 100 ccm physiol. NaCl-Lösung	185,8	75	30,5
29	5,0 g Glykolsäure mit Natronlauge neutralisiert	186		31

Wert von 45,3 mg neugebildeten Acetons pro 1 l Durchblutungsblut übersteigt nur um 4 mg die höchste von Mochizuki erhaltene Zahl und steht in ihrer absoluten Größe weit hinter den Werten zurück, die bei der Durchblutung der Leber bei Zusatz von Substanzen, die als Acetessigsäurebildner anzusprechen sind, beobachtet worden sind.

Zum Vergleich gebe ich in Tabelle II (S. 288) die 5 von Mochizuki unter Zusatz von glykolsaurem Natrium zum Durchblutungsblute angestellten Versuche (Versuch 1 bis 5 der Tabelle II), sowie den einen von Embden und Loeb mit glykolsaurem Natrium ausgeführten Versuch wieder (Versuch 29 der Tabelle II).

Ein Vergleich der in Tabelle II wiedergegebenen Werte mit den von mir erhaltenen Resultaten (Tabelle I) zeigt völlige Übereinstimmung.

Die Resultate, die ich bei Zusatz von glykolsaurem Ammonium zum Durchblutungsblut erhalten habe, sind in der Tabelle III wiedergegeben.

Tabelle III.

Versuchs-Nr.	Gewicht des Hundes g	Gewicht der Leber g	Durchblutungsflüssigkeit	Durchblutungs- Zeit Min.	Durchblutungs- Zahl	Druck mm Hg	Temperatur des Blutes °C	Menge d. pro Liter Blut neugebild. Acetons mg
4	7500	243	1400 ccm Rinderblut { 2 g Glykolsäure mit Ammoniak neutral. 100 ccm physiolog. NaCl-Lösung	76	18	24—36	35—37	34,4
5	5900	207	1400 ccm Rinderblut { 2 g Glykolsäure mit Ammoniak neutral. 100 ccm physiolog. NaCl-Lösung	75	12	42—28	40—36	35,9
6	3000	80	1400 ccm Rinderblut { 2 g Glykolsäure mit Ammoniak neutral. 100 ccm physiolog. NaCl-Lösung	78	7	12—44	36—38	28,2

Wie aus der Tabelle III ersichtlich ist, vermag Zusatz von glykolsaurem Ammonium ebensowenig wie Zusatz von glykol-

saurem Natrium zum Durchblutungsblut innerhalb der von mir benutzten Technik die Größe und den Umfang der Acetessigsäurebildung in der überlebenden Leber zu steigern. Ein Unterschied des Neutralisationsmittels bezüglich der Größe der Acetessigsäurebildung in den unter Zusatz von Glykolsäure ausgeführten Durchstömungsversuchen ist daher nicht vorhanden.

Zum Vergleich füge ich die von Embden und Loeb unter Zusatz von glykolsaurem Ammonium zur Durchströmungsflüssigkeit angestellten Versuche bei (Tabelle IV).

Tabelle IV.
(Versuche von Embden und Loeb.)

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Hundes kg	Gewicht der Leber g	Zugesetzte Substanz g	Gebildete Menge Aceton pro Liter Durchblutungsblut mg	Bemerkungen
30	8.VII.	6,1	210	4,0 g Glykolsäure mit NH_3 neutralisiert	67	
31	9.VII.	6,0	182	do.	47	
32	14.VII.	8,0	160	do.	85	
33	16.VII.	8,3	183	do.	41	
34	17.VII.	4,2	96	do.	53	Davon 34 mg aus Acetessigsäure. 500 ccm Blut ergeben 81,5 mg Dibenzalaceton. S.P. (unkorr.) 110°.

Von den 5 Versuchen der Tabelle IV, die Embden und Loeb ausgeführt haben, zeigen 2 Versuche (Versuch 31 und Versuch 33) eine Größe der Acetonbildung pro Liter Durchblutungsblut von 47 und 41 mg, ein Wert, der meines Erachtens zu niedrig ist, um zu dem Schlusse zu berechtigen, daß in diesen Versuchen das glykolsaure Ammonium das Material zur Bildung der Acetessigsäure liefert. Dagegen ist in Versuch 30, 32 und 34 von Embden und Loeb eine Bildung von 67, 85 und 53 mg Aceton pro Liter Durchblutungsblut beobachtet worden, Werte, die zweifelsohne innerhalb der Größenordnung sind, aus der man bisher auf eine Beteiligung der hinzugesetzten Substanz an der Bildung der im Durchströmungsblute auftretenden Acetessigsäure geschlossen hat. Im Gegensatz zu Embden und Loeb habe ich in meinen Versuchen

keine analoge Steigerung der Acetessigsäurebildung nach Zusatz von glykolsaurem Ammonium beobachten können. Wie diese Differenz in den Resultaten von mir einerseits und Embden und Loeb andererseits zu erklären ist, ist vorläufig nicht zu übersehen, jedoch scheint es mir zur Beurteilung der Frage, ob Glykolsäure in der überlebenden Leber in Acetessigsäure übergeht, notwendig zu sein, darauf hinzuweisen, daß von den 17 unter Zusatz von Glykolsäure angestellten Durchströmungsversuchen 14 ein negatives Resultat aufweisen und nur in 3 Versuchen eine Steigerung des Umfangs der Acetessigsäurebildung beobachtet worden ist. Unter diesen Umständen liegt die Vermutung nahe, daß in diesen drei positiven Versuchen Bedingungen ausschlaggebend gewesen sind, die möglicherweise nicht mit der Glykolsäure in direktem Zusammenhang stehen.

Als Resultat dieser Arbeit möchte ich bezeichnen, daß Glykolsäure in meinen Versuchen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mochizuki und im Gegensatz zu den Versuchen von Embden und Loeb den Umfang der Acetessigsäurebildung in der überlebenden Leber nicht zu steigern vermag.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

XXIII. Mitteilung.

Über den Einfluß der Propionsäure auf die Acetessigsäurebildung aus Essigsäure in der überlebenden Leber.

Von

Kensaburo Honjio.

(Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik der Kgl. Charité zu Berlin.)

(Eingegangen am 10. März 1914.)

Die Beobachtung von Adam Loeb[1]), daß Essigsäure die Größe der Acetessigsäurebildung in der überlebenden Leber erheblich steigert, ist von E. Friedmann[2]) für die chemische Deutung der Vorgänge, die den Abbau der normalen Fettsäuren beherrschen, herangezogen worden.

E. Friedmann schreibt: „Da Essigsäure die Größe der Acetessigsäurebildung in der überlebenden Leber beträchtlich erhöht, so ist zu erwarten, daß sämtliche normalen Fettsäuren auch Acetessigsäure bilden. Tatsächlich aber entsteht Acetessigsäure nur aus den normalen Fettsäuren mit gerader Kohlenstoffatomzahl, nicht aus den normalen Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffatomzahl. Daraus folgt, daß der paarige Abbau der normalen, gesättigten Fettsäuren nicht unter Essigsäureabspaltung verläuft. Aus dieser Schlußfolgerung ergibt sich weiter, daß die Annahme, daß die normalen, gesättigten Fettsäuren über die β-Ketonsäuren durch Säurespaltung zu den um 2 Kohlenstoffatome ärmeren Fettsäuren abgebaut werden, nicht zu Recht besteht."

---

[1]) Adam Loeb, diese Zeitschr. **46**, 118, 1912.

[2]) E. Friedmann, diese Zeitschr. **55**, 436, 1913.

Diese Schlußfolgerungen von E. Friedmann sind teils mißverstanden worden, teils haben sie Veranlassung zu Einwänden logischer und tatsächlicher Art gegeben, deren Diskussion angezeigt erscheint.

L. Hermanns[1]) hält es für einen „Widerspruch, wenn zunächst bewiesen wird, daß nur unter bestimmten Bedingungen die Leber aus Essigsäure Acetessigsäure bildet, und dann am Schlusse diesem Vorgange wieder allgemeine Gültigkeit beigemessen wird". Demgegenüber ist zu bemerken, daß die Bedingungen, unter denen die Leber Essigsäure in Acetessigsäure regelmäßig überzuführen vermag, die gleichen sind, unter denen sämtliche normalen Fettsäuren im Durchströmungsversuche auf ihre Fähigkeit, Acetessigsäure zu bilden, geprüft worden sind. Innerhalb dieser gleichen und experimentell faßbaren Bedingungen ist es durchaus berechtigt, dem Vorgange der Acetessigsäurebildung aus Essigsäure allgemeine Gültigkeit zuzusprechen. Auch der weitere Einwand, den Hermanns erhebt, daß wohl ein Unterschied darin bestehen dürfte, ob eine Fettsäure dem Durchblutungsblute zugesetzt wird oder die gleiche Menge Essigsäure der Leber auf einmal angeboten wird, wodurch ein ganz anderes Reaktionsgleichgewicht geschaffen wird, entbehrt der Beweiskraft, da ihm vorläufig eine gesicherte experimentelle Grundlage fehlt. Allerdings ist anzuerkennen, daß der experimentelle Nachweis, daß intermediär auftretende Essigsäure in Acetessigsäure in der überlebenden Leber übergeht, zurzeit noch aussteht. Wenn schließlich Hermanns hervorhebt, daß wir uns den Abbau einer Fettsäure nicht erklären können, wenn wir Ketone als intermediäre Abbaustufe annehmen würden, so sei betont, daß in den Schlußfolgerungen von E. Friedmann auch nicht andeutungsweise ein Hinweis nach dieser Richtung enthalten ist. Das Hervorheben der Tatsache, daß die normalen, gesättigten Fettsäuren über die β-Ketonsäuren nicht durch Säurespaltung zu den um 2 Kohlenstoffatome ärmeren Fettsäuren abgebaut werden, macht in keiner Weise die Annahme zwingend, daß bei Nichteintreten der Säurespaltung die normalen Fettsäuren über die β-Ketonsäuren durch Ketonspaltung abgebaut werden, da sehr

[1]) Leo Hermanns, diese Zeitschr. 59, 333, 1914.

wohl eine oxydative Sprengung zwischen α- und β-Kohlenstoffatom der normalen Fettsäuren im Bereich der Möglichkeit liegt, die dann weder nach dem Schema der Säure- noch dem der Ketonspaltung der β-Ketonsäuren verläuft. Hierzu kommt, daß bereits Dakin[1]) nachgewiesen hat, daß die Ketone schon deshalb nicht als Abbauprodukte der zugehörigen β-Ketonsäuren in Betracht kommen, weil die physiologische Oxydation der Ketone mitunter nachweislich zu anderen Endprodukten führt als der Abbau der entsprechenden β-Ketonsäuren, Versuche, die von Hermanns[2]) teils wiederholt, teils in wertvoller Weise erweitert worden sind. Selbst wenn auf direktem Wege gezeigt werden könnte, daß der Abbau der normalen Fettsäuren über die β-Ketonsäuren nicht nach Art der Säurespaltung der β-Ketonsäuren verläuft, so würde dies in keiner Weise die Regel des paarigen Abbaues der normalen Fettsäuren berühren, da die Richtigkeit dieses Abbaumodus sowohl für die aliphatischen wie für die aromatischen Fettsäuren einwandfrei bewiesen ist. Wohl aber würde die hier gewonnene Einsicht einen tieferen Einblick in die chemischen Vorgänge, deren Ausdruck die Regel des paarigen Abbaues der normalen Fettsäuren ist, gestatten.

Außer von L. Hermanns sind die Schlußfolgerungen von E. Friedmann von Gustav Embden und Adam Loeb[3]) beanstandet worden.

Diese Forscher erheben zwei Einwände.

Sie machen zunächst darauf aufmerksam, daß eine nach vorhergehender β-Oxydation einsetzende Spaltung zwischen dem α- und dem β-Kohlenstoffatom einer normalen Fettsäure keineswegs mit Notwendigkeit zur Abspaltung gerade eines Essigsäuremoleküls zu führen braucht, und verweisen auf die Ansicht von Embden, Salomon und Schmidt[4]), nach der die vom Fettsäuremolekül abgespaltene Säure mit 2 Kohlenstoffatomen auch Glykolsäure und Glyoxylsäure sein kann.

---

[1]) Nach H. D. Dakin, Journ. of Biolog. Chem. 6, 223, 1909, geht Benzylacetessigester im Tierkörper in Benzoesäure, das zugehörige Keton dagegen, das Benzylaceton, in Phenylessigsäure über.

[2]) Leo Hermanns, Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 232, 1913.

[3]) Gustav Embden und Adam Loeb, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 246, 1913.

[4]) G. Embden, H. Salomon, Fr. Schmidt, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 145, 1906.

Demgegenüber ist zu bemerken, daß die Säurespaltung der β-Ketonsäuren, die als chemische Analogie des Abbaues der normalen Fettsäuren in Betracht gezogen wird, im chemischen Experiment zu Essigsäure führt. Nimmt man also an, daß die Carboxylgruppe und das der Carboxylgruppe benachbarte Kohlenstoffatom von der Kohlenstoffatomkette einer normalen Fettsäure unter Bildung von Glykolsäure oder Glyoxylsäure losgelöst wird, eine Annahme, die wir für durchaus möglich halten, so verläuft diese Abbaureaktion eben nicht nach dem Schema der Säurespaltung der β-Ketonsäuren. Der Einwand, daß eine nach vorhergehender β-Oxydation einsetzende Spaltung zwischen α- und β-Kohlenstoffatom keineswegs mit Notwendigkeit zur Abspaltung gerade eines Essigsäuremoleküls zu führen braucht, steht daher in keinem Zusammenhang mit den Schlußfolgerungen von E. Friedmann.

Anders ist es mit dem zweiten Einwand, den Embden und Loeb erheben.

Selbst für den Fall, daß der Abbau der Fettsäuren unter Abspaltung von Essigsäuremolekülen erfolgt, gehen nach ihrer Ansicht die Schlußfolgerungen von E. Friedmann zu weit. Sie schreiben[1]: „Friedmann berücksichtigt nicht, daß bei dem Abbau von unverzweigten Fettsäuren mit ungerader C-Atomzahl unter typischer β-Oxydation im Knoopschen Sinne stets Propionsäure auftreten muß, von der gerade durch die Versuche der vorliegenden Arbeit festgestellt ist, daß sie in Übereinstimmung mit n-Valeriansäure die Acetessigsäurebildung aus Essigsäure hemmt. Welcher auch der hierbei in Betracht kommende Chemismus sein mag, jedenfalls ist durch das Auftreten von Propionsäure neben Essigsäure das Ausbleiben der Acetessigsäurebildung aus etwa beim Abbau von Fettsäuren mit ungerader C-Atomzahl auftretender Essigsäure ohne weiteres verständlich."

Die Beobachtungen von Emden und Loeb sind von E. Friedmann nicht berücksichtigt worden, weil sie erheblich später veröffentlicht worden sind als die Versuche von E. Friedmann. Die Richtigkeit der Beobachtungen von Embden und Loeb vorausgesetzt, scheinen sie allerdings auf den ersten Blick geeignet zu sein, eine ausreichende Erklärung für das Ausbleiben

[1]) Gustav Emden und Adam Loeb, l. c., S. 256.

der Acetessigsäurebildung beim Abbau der Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffatomzahl zu geben. Eine genauere Durchsicht der Versuchsprotokolle von Embden und Loeb ergibt jedoch, daß die Versuchsbedingungen, die Embden und Loeb gewählt haben, nicht den Verhältnissen entsprechen, wie sie beim Abbau der Säuren mit ungerader Kohlenstoffatomzahl zu erwarten sind.

Um ein Beispiel zu geben, müßte n-Valeriansäure unter typischer β-Oxydation Propionsäure und Essigsäure liefern.

$$CH_3.CH_2.CH_2.CH_2.COOH \rightarrow CH_3.CH_2.COOH; \quad CH_3.COOH.$$

Bei dem Abbau der n-Valeriansäure würde also auf 1 Molekül Propionsäure 1 Molekül Essigsäure, bei der nächsthöheren normalen Fettsäure mit ungerader Kohlenstoffatomzahl jedoch schon 1 Molekül Propionsäure auf 2 Moleküle Essigsäure kommen. Je höher die Fettsäure mit ungerader Kohlenstoffatomzahl ist, die dem Abbau unterliegt, um so mehr würde sich das Verhältnis der Essigsäure zur Propionsäure zugunsten der Essigsäure ändern. Einzig beim Abbau der n-Valeriansäure würde auf 1 Molekül Propionsäure 1 Molekül Essigsäure kommen, und ein Gemisch von Propionsäure und Essigsäure, in dem das molekulare Verhältnis der Propionsäure zur Essigsäure größer als 1 ist, würde nur dann physiologische Verhältnisse wiedergeben, wenn Anlaß zu der Vermutung vorliegen würde, daß die Essigsäure im Tierkörper erheblich rascher abgebaut wird als die Propionsäure.

Embden und Loeb setzen nun der Durchblutungsflüssigkeit in den zwei Versuchen, die sie unter Zusatz von Essigsäure und Propionsäure ausgeführt haben, 2 g Essigsäure als Natrium-Salz und 4 g Propionsäure mit Ammoniak neutralisiert hinzu. Bei einer Wahl der molekularen Verhältnisse von Essigsäure zu Propionsäure von 1:1 würde sich für 2 g Essigsäure jedoch nur eine Menge von 2,47 g Propionsäure ergeben. Die Versuchsbedingungen von Embden und Loeb zeigen daher eine Anhäufung von Propionsäure zuungunsten der Essigsäure, wie sie beim Abbau der Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffatomzahl nicht zu erwarten sind, und das Ergebnis dieser Versuche kann für die Frage, ob das Auftreten von Propionsäure neben Essigsäure das Ausbleiben der Acetessigsäurebildung aus etwa beim Abbau der Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffatomzahl auftretender Essigsäure hindert, nicht ausschlaggebend sein.

Ich habe daher auf Veranlassung von Herrn Prof. E. Friedmann die von Embden und Loeb aufgeworfene Frage, ob Propionsäure die Bildung von Acetessigsäure aus Essigsäure in der überlebenden Leber hemmt, unter Berücksichtigung der oben geschilderten Überlegungen von neuem geprüft.

Als Durchblutungsflüssigkeit diente ein Gemisch von 1400 ccm Rinderblut und 100 ccm Wasser, das 2,7 g essigsaures Natrium und 2,3 g propionsaures Natrium enthielt. Unter Berücksichtigung des Krystallwassers der angewandten Salze entsprachen die gelösten Salze 1,2 g Essigsäure und 1,5 g Propionsäure. Das molekulare Verhältnis der Essigsäure und der Propionsäure in der Durchblutungsflüssigkeit ist demnach 1:1.

Abweichend von der Versuchsanordnung von Embden und Loeb schien es mir wünschenswert, die Salzkonzentration möglichst niedrig zu halten, da die Anhäufung von Salzen in der Durchblutungsflüssigkeit Bedingungen schafft, deren Einfluß auf die Größe der Acetessigsäurebildung bisher experimentell nicht ausreichend untersucht worden ist[1]).

Die Technik der Durchblutungsversuche war die übliche. Ich verwendete zu den Versuchen die Lebern von Hunden, die 24 Stunden gelagert hatten.

Die Resultate, die ich bei der Durchströmung der Leber unter gleichzeitigem Zusatz von Essigsäure und Propionsäure erhalten habe, sind in der Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Gewicht des Hundes g	Gewicht der Leber g	Temperatur des Blutes °C	Druck mm Hg	Durchblutungszeit Min.	Durchblutungszahl	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons mg
1	4900	138	35—38	20—22	75	14	127,0
2	4200	104	38—39	18—44	84	9	89,9
3	4300	137	37—36	10—24	75	10	55,2
4	4900	152	37—40	20—50	85	9	49,0
5	6520	157	38—37	22—32	77	9	41,4
6	3700	110	40—38	20—70	87	4	14,5
7	3000	85	40—38	26—66	80	3	12,3

[1]) Über zwei Versuche nach dieser Richtung siehe Gustav Embden und Joseph Wirth, diese Zeitschr. 27, 11, 1910.

Von den 7 Versuchen der Tabelle I ist in 2 Versuchen, Versuch 6 und 7, eine Neubildung von Acetessigsäure, als deren Quelle die hinzugesetzte Substanz betrachtet werden kann, nicht eingetreten. In diesen Versuchen mußte der Druck bis zu 70 mm Quecksilber im Versuch 6 und bis zu 66 mm Quecksilber im Versuch 7 gesteigert werden. Trotzdem floß das Gesamtblut im Versuch 6 nur 4 mal und im Versuch 7 nur 3 mal durch die Leber. Wir geben diese beiden Versuche nur der Vollständigkeit wegen wieder und würden uns unter anderen Verhältnissen für berechtigt halten, sie als mißlungen zu vernachlässigen. Jedenfalls wird jeder, der Erfahrung in Durchblutungsversuchen hat, es ablehnen, aus diesen beiden Versuchen irgendwelche Schlüsse zu ziehen.

In den anderen 5 Versuchen, Versuch 1 bis 5, liegt der Wert des pro Liter Durchblutungsflüssigkeit neugebildeten Acetons zwischen 41,4 und 127 mg. In dem Versuch 5 wird bei einer als einwandfrei anzusehenden Durchblutung ein Wert von 41,4 mg für das pro 1 l Durchblutungsblut neugebildete Aceton erreicht, ein Wert, der möglicherweise der Ausdruck für eine hemmende Wirkung der Propionsäure auf den Umfang der Acetessigsäurebildung aus Essigsäure ist. Dagegen ist in den Versuchen 1 bis 4 eine hemmende Wirkung der Propionsäure auf die Größe der Acetessigsäurebildung aus Essigsäure nicht oder nicht deutlich vorhanden. In Versuch 1 und 2 werden sogar Werte für das pro Liter Blut neugebildete Aceton erhalten, die als recht hohe zu bezeichnen sind.

Zum Vergleich lasse ich die von Embden und Loeb ausgeführten Versuche folgen:

Tabelle II.
(Versuche von Embden und Loeb.)

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Hundes kg	Gewicht der Leber g	Dem Durchblutungsblut zugesetzte Menge Essigsäure	Außerdem zugesetzt	Gebild. Menge Aceton pro Liter Durchblutungsblut mg
3	24. VI. 1913	6,0	131	2,0 g Essigsäure als Na-Salz	4,0 g Propionsäure (mit NH_3 neutralisiert)	28
4	22. VII. 1913	5,3	125	do.	do.	28

Ein Vergleich der von mir (Tabelle I) und von Embden und Loeb erhaltenen Zahlen (Tabelle II) zeigt eine völlige Verschiedenheit der Resultate, die in diesen beiden Tabellen niedergelegt sind. Während aus meinen Versuchen sich ergibt, daß Propionsäure die Acetessigsäurebildung aus Essigsäure nicht oder nicht deutlich zu hemmen vermag, führen die Versuche von Embden und Loeb diese Forscher gerade zu der entgegengesetzten Ansicht, daß Propionsäure die Acetessigsäurebildung aus Essigsäure völlig hemmt. Eine Erklärung für diese Divergenz der Ergebnisse dürfte wohl in den verschiedenen Versuchsbedingungen, die ich und Embden und Loeb eingehalten haben, liegen, wobei es unentschieden bleiben soll, ob der geringere Salzgehalt oder das anders gewählte Verhältnis von Propionsäure zu Essigsäure für die positiven Resultate, die ich erhalten habe, verantwortlich sind. Jedenfalls trifft die Behauptung von Embden und Loeb, daß Propionsäure die Acetessigsäurebildung aus Essigsäure hemmt, nur für bestimmte, experimentell nicht ausreichend erforschte Bedingungen zu und ist innerhalb der von mir eingehaltenen Versuchsbedingungen unzutreffend.

Wie eingangs auseinandergesetzt worden ist, habe ich meine Versuchsbedingungen aus der Überlegung gewählt, daß beim Abbau der Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffatomzahl im ungünstigsten Falle des Abbaues der n-Valeriansäure 1 Molekül Propionsäure auf 1 Molekül Essigsäure treffen kann, während für die höheren Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffatomzahl 1 Molekül Propionsäure auf mehrere Moleküle Essigsäure unter typischer β-Oxydation trifft.

Mit dem Nachweis, daß die Propionsäure in einem Gemisch von 1 Molekül Propionsäure und 1 Molekül Essigsäure die Acetessigsäurebildung aus Essigsäure nicht zu hemmen vermag, wird der von Embden und Loeb geäußerten Ansicht, nach der durch das Auftreten von Propionsäure neben Essigsäure das Ausbleiben der Acetessigsäurebildung aus etwa beim Abbau von Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffatomzahl auftretender Essigsäure ohne weiteres verständlich ist, der experimentelle Boden entzogen.

Es ist aber nicht zu verkennen, daß, wenn auch die tatsächlichen Grundlagen, die Embden und Loeb als Stütze

ihrer Kritik der Schlußfolgerungen von E. Friedmann anführen, nicht zutreffend sind, doch innerhalb des Gedankenganges von Embden und Loeb ein Einwand liegt, der ernste Beachtung beansprucht. Wenn der Beobachtung von Embden und Loeb, daß n-Valeriansäure die Bildung von Acetessigsäure aus Essigsäure völlig hemmt, allgemeine Gültigkeit zukommt, so könnte diese Tatsache möglicherweise das Ausbleiben einer Acetessigsäurebildung aus etwa beim Abbau der n-Valeriansäure auftretender Essigsäure im Durchströmungsversuche erklären. Denn selbst für den Fall, daß auch diese Hemmungsreaktion an bestimmte Mengenverhältnisse gebunden sein sollte, würde der Abbau der n-Valeriansäure im Durchströmungsversuche, falls er nach Art einer typischen β-Oxydation verläuft, von Reaktionsbedingungen ausgehen, in denen die Anfangskonzentration der n-Valeriansäure eine große und diejenige der entstandenen Propionsäure und Essigsäure eine kleine wäre, und es wäre immerhin möglich, daß die Resultate der beiden von Embden und Loeb unter Zusatz von n-Valeriansäure ausgeführten Versuche nach dieser Richtung Verwendung finden können. Aber entscheiden wird man diese Frage auf Grund der erwähnten Versuche von Embden und Loeb wohl kaum, und dies um so weniger, als das von Embden und seinen Mitarbeitern aufgestellte „Prinzip der gegenseitigen Verdrängung verschiedener Substanzen" für die Verhältnisse der Durchströmungsversuche in Betracht kommen kann, es aber zum mindesten unerwiesen ist, ob und inwieweit es für die Verhältnisse der Stoffwechselversuehe, in denen doch die Möglichkeiten zur Regulation der Konzentrationsverhältnisse im Blut in recht weitgehender Weise ausgenützt werden, zur Geltung gelangt. Unter diesen Umständen dürfte die Tatsache, daß n-Valeriansäure, in Übereinstimmung mit den Resultaten der Durchströmungsversuche, auch im Stoffwechselversuche am schweren Diabetiker nach den Versuchen von Baer und Blum[1]) kein Bildner von Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure ist, vielleicht doch zugunsten der einfacheren Vorstellung, daß beim Abbau der n-Valeriansäure im Tierkörper keine Substanzen entstehen, die Material zur Bildung von Acetessigsäure und β-Oxybutter-

[1]) Julius Baer und Leon Blum, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 55, 94, 1906.

säure liefern, gedeutet werden. Daß aber diese Deutung keine zwingende ist, geht schon zur Genüge aus dem Umstande hervor, daß sie sich auf negative Versuchsergebnisse, dem Ausbleiben der Bildung von Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure, aufbaut, und diesen negativen Resultaten naturgemäß eine indirekte Beweisführung entspricht. Eine Klärung dieser Verhältnisse kann unseres Erachtens nur der direkte Versuch bringen, bei dem es glückt, dasjenige Bruchstück des Fettsäuremoleküls zu isolieren, das beim paarigen Abbau der Fettsäuren unter Loslösen der Carboxylgruppe und des der Carboxylgruppe benachbarten Kohlenstoffatoms entsteht.

Ein Ansatz nach dieser Richtung liegt in den Fütterungsversuchen, die E. Friedmann und W. Türk mit α-Phenylbuttersäure[1]) ausgeführt haben, vor. Weitere Aufklärung ist von Versuchen, die die Erforschung des Schicksals der α-substituierten Fettsäuren im Tierkörper zur Aufgabe haben, und die zurzeit im hiesigen Laboratorium im Gange sind, zu erwarten.

[1]) E. Friedmann und W. Türk, diese Zeitschr. **55**, 432, 1913.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

XXIV. Mitteilung.

Verhalten der Isovaleriansäure und des Acetaldehyds bei der Leberdurchblutung glykogenreicher Tiere.

Von

K. Iwamura.

(Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik der Kgl. Charité zu Berlin.)

(Eingegangen am 10. März 1914.)

Die engen Beziehungen, die zwischen dem Glykogengehalt der Leber und dem Auftreten von β-Oxybuttersäure bestehen, haben zur Prüfung der Frage Veranlassung gegeben, ob auch im Durchströmungsversuche ein Einfluß des Glykogens auf den Umfang der Acetessigsäurebildung nachzuweisen ist.

Die ersten Versuche nach dieser Richtung sind von Embden und Wirth[1]) ausgeführt worden. Embden und Wirth durchbluteten glykogenreiche Lebern unter Zusatz von Isovaleriansäure und n-Capronsäure, die in den Versuchen von Embden und seinen Mitarbeitern bei der Leberdurchblutung von Hunden, die 24 Stunden gehungert hatten, als Bildner von Acetessigsäure erkannt waren.

Embden und Wirth stellten 6 Versuche an, in denen sie die glykogenreiche Leber unter Zusatz von Isovaleriansäure durchbluteten. Von diesen 6 Versuchen zeigten 5 eine deutliche Hemmung der Acetessigsäurebildung (Versuche 29 bis 33), während 1 Versuch (Versuch 34) eine ausgesprochene Hemmungswirkung nicht erkennen ließ. In dem einen Versuche, in dem sie die glykogenreiche Leber mit n-Capronsäure durchbluteten,

[1]) Gustav Embden und Joseph Wirth, diese Zeitschr. 27, 1, 1910.

blieb eine hemmende Wirkung auf den Umfang der Acetonbildung völlig aus.

Außer Isovaleriansäure und n-Capronsäure ist die Essigsäure auf ihr Verhalten in der glykogenreichen Leber geprüft worden. Die Versuche sind annähernd gleichzeitig und unabhängig voneinander von E. Friedmann[1]), Gustav Embden und Adam Loeb[2]) ausgeführt worden und haben zu dem übereinstimmenden Resultat geführt, daß in der glykogenreichen Leber eine Bildung von Acetessigsäure aus Essigsäure im Durchströmungsversuche nicht stattfindet, während in der Leber von Hunden, die 24 Stunden gehungert haben, nach dem Versuche von Adam Loeb[3]) Essigsäure ein kräftiger Bildner von Acetessigsäure ist.

Die Fragestellungen, die von E. Friedmann an dieses Resultat geknüpft worden sind, sind in einer unter Leitung von E. Friedmann ausgeführten Arbeit von J. Mochizuki[4]) weiter verfolgt worden. Mochizuki durchblutete die glykogenreiche Leber mit Buttersäure, β-Oxybuttersäure, Crotonsäure und in Wiederholung der Versuche von Embden und Wirth mit Isovaleriansäure. Er kam auf Grund seiner Versuche zu dem Resultat, daß Buttersäure, β-Oxybuttersäure, Crotonsäure und Isovaleriansäure auch in der glykogenreichen Leber als Bildner von Acetessigsäure anzusehen sind.

Die Beobachtung, daß Isovaleriansäure auch in der glykogenreichen Leber in Acetessigsäure übergeht, steht, wie Embden und Loeb[5]) hervorheben, im Widerspruch zu den Angaben von Embden und Wirth. Zur Erklärung dieser abweichenden Ergebnisse verweisen sie auf das Vorhandensein abweichender Versuchsbedingungen, wie die Möglichkeit eines geringeren Glykogengehalts und etwas längere Versuchszeit. Von diesen Erklärungsmöglichkeiten ist nur die erste wesentlich, da die von Mochizuki und die auch sonst im hiesigen Laboratorium ein-

---

[1]) E. Friedmann, diese Zeitschr. 55, 436, 1913.

[2]) Gustav Embden und Adam Loeb, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 246, 1913.

[3]) Adam Loeb, diese Zeitschr. 46, 118, 1912.

[4]) Junichi Mochizuki, diese Zeitschr. 55, 446, 1913.

[5]) Gustav Embden und Adam Loeb, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 246, 1913.

gehaltene Versuchszeit sowohl in den positiven wie in den negativen Versuchen annähernd die gleiche ist. Dagegen könnte die Möglichkeit, daß die Lebern der Versuchstiere von Mochizuki einen zu geringen Glykogengehalt hatten, den Wert der Versuchsergebnisse von Mochizuki beeinträchtigen. Ich habe daher auf Veranlassung von Herrn Prof. E. Friedmann die Versuche von Mochizuki mit Isovaleriansäure wieder aufgenommen und geprüft, ob nach Zusatz von Isovaleriansäure der Umfang der Acetessigsäurebildung in der überlebenden Leber von ihrem Gehalt an Glykogen abhängig ist.

Zur Gewinnung glykogenreicher Lebern habe ich den Versuchstieren größere Mengen Traubenzucker mittels Schlundsonde eingegossen. In den Versuchen 1 bis 3 wurden den Tieren je 500 g Traubenzucker verabfolgt, im Versuch 4 1000 g Traubenzucker. Der geringe Glykogengehalt in diesem Versuche erklärt sich aus dem Auftreten von Durchfällen bei diesem Tiere.

In sämtlichen Versuchen wurde die letzte Traubenzuckerapplikation 3 bis 5 Stunden vor der Durchblutung vorgenommen. Vor Beginn der Durchblutung wurde ein Leberlappen abgebunden, in dem die Glykogenbestimmung nach Pflüger ausgeführt wurde.

Als Durchblutungsflüssigkeit diente ein Gemisch von 1400 ccm Rinderblut und 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung, die 2 g Isovaleriansäure mit Natronlauge neutralisiert enthielt.

Die Resultate, die ich bei der Durchblutung der Leber von mit Traubenzucker vorbehandelten Tieren unter Zusatz von Isovaleriansäure erhalten habe, sind in der Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I.

Versuchs-Nr.	Gewicht des Hundes g	Gewicht der Leber g	Glykogengehalt der Leber %	Temperatur des Blutes °C	Druck mm Hg	Durchblutungs- Zeit Min.	Durchblutungs- Zahl	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons mg
1	6000	313	**21,60**	35—37	18—24	79	9	**66,0**
2	5000	252	**11,98**	36—38	18—44	78	12	**68,4**
3	5200	160	**4,24**	36—39	18—40	79	11	**67,9**
4	6500	258	**1,45**	32—36	30—40	78	10	**65,1**

Wie die Tabelle I zeigt, ist der Glykogengehalt der Versuchstiere ein wechselnder. Er schwankt zwischen 1,45 % im

Versuch 4 und 21,6 % im Versuch 1. Trotz dieses wechselnden Gehaltes an Glykogen ist die Größe des neugebildeten Acetons auffallend konstant. Beim niedrigsten Glykogengehalt von 1,45 % beträgt die Größe des pro Liter Blut neugebildeten Acetons 65,1 mg (Versuch 4), beim höchsten von mir beobachteten Glykogengehalt von 21,6 % 66 mg (Versuch 1). Der höchste von mir beobachtete Wert des pro Liter Blut neugebildeten Acetons erreicht bei einem Glykogengehalt der Leber von 4,24 % 67,9 mg (Versuch 3); der niedrigste beträgt 58,5 mg bei einem Glykogengehalt von 11,98 % (Versuch 2).

Diese Versuche dürften wohl eindeutig beweisen, daß für die Isovaleriansäure eine Abhängigkeit des Umfanges der Acetessigsäurebildung von dem Glykogengehalt der Leber innerhalb unserer Versuchsbedingungen nicht besteht. Sie bringen eine völlige Bestätigung der Ergebnisse von Mochizuki und stehen ebenso wie die Versuche von Mochizuki in einem unaufgeklärten Gegensatz zu den Resultaten von Embden und Wirth.

Vergleicht man weiter die von Mochizuki und mir erhaltenen Resultate mit den Werten, die bei der Durchblutung der Leber von Hunden, die 24 Stunden gehungert haben, unter Zusatz von Isovaleriansäure erhalten worden sind, so ergibt sich folgendes: In den beiden Versuchen von Embden, Salomon und Schmidt[1]), die allerdings unter Einhalten einer etwas kürzeren Versuchszeit ausgeführt worden sind, hatte Isovaleriansäure je 73 mg Aceton pro Liter Durchblutungsblut gebildet, in den Versuchen von Embden und Engel[2]) 63 und 71 mg Aceton pro Liter und in den drei Versuchen von Embden und Wirth[3]) 71, 62 und 60 mg Aceton pro Liter. In den beiden Versuchen, die dagegen Mochizuki[4]) an Hunden ausgeführt hat, die sich im Zustand der Glykogenanreicherung befunden haben, sind 52,8 und 54,9 mg Aceton pro Liter Blut aus Isovaleriansäure gebildet worden, und in den vier Versuchen, die ich an Hunden, die sich ebenfalls im Zustand der Glyko-

[1]) Embden, Salomon und Schmidt, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 140, 1906.

[2]) Embden und Engel, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 325, 1908.

[3]) Embden und Wirth, l. c. S. 6.

[4]) Junichi Mochizuki, l. c. S. 449.

genanreicherung befanden, 66,0, 58,5, 67,9 und 65,1 mg Aceton pro Liter Blut aus Isovaleriansäure erhalten worden. Ein Unterschied der Größenordnung des aus Isovaleriansäure pro Liter Blut neugebildeten Acetons bei der Durchblutung der Leber von Hunden, die sich im Zustand der Glykogenverarmung, und solchen, die sich im Zustand der Glykogenanreicherung befanden, ist daher innerhalb unserer Versuchsbedingungen nicht vorhanden. Auch dieses Resultat ist von Interesse, da es bisher experimentell nicht aufgeklärt ist, ob der absolute Gehalt an Glykogen, oder die Vorgänge, die im Stoffwechsel der Leber die Anreicherung des Glykogens begleiten, für das Ausbleiben der Acetessigsäurebildung aus bestimmten Substanzen im Durchströmungsversuche verantwortlich sind.

Im Anschluß an die Durchströmungsversuche glykogenreicher Lebern, die ich unter Zusatz von Isovaleriansäure ausgeführt habe, habe ich in Fortsetzung der Versuche von Mochizuki das Verhalten des Acetaldehyds in der überlebenden, glykogenreichen Leber geprüft.

E. Friedmann[1]) hat beobachtet, daß der Acetaldehyd, als Aldehydammoniak dem Durchströmungsblute zugesetzt, den Umfang der Acetessigsäurebildung bei der Leberdurchblutung von Hunden, die 24 Stunden gehungert haben, zu steigern vermag.

Bei der chemisch leichten Kondensierbarkeit des Acetaldehyds zum Aldol und der nachgewiesenen Bildung von Acetessigsäure aus Aldol hat E. Friedmann die Vermutung ausgesprochen[2]), daß die Synthese der Acetessigsäure bei der Durchblutung aus Aldehyd über die Zwischenstufe des Aldols verläuft und diese Reaktionskette in folgender Weise formuliert:

$$\text{I. } CH_3.COH + CH_3.COH = CH_3.CH(OH).CH_2.COH.$$
$$\text{II. } CH_3.CH(OH).CH_2.COH + O = CH_3.CH(OH).CH_2.COOH$$
$$\text{III. } CH_3.CH(OH).CH_2.COOH + O = CH_3.CO.CH_2.COOH.$$
$$\text{IV. } CH_3.CO.CH_2.COOH = CH_3.CO.CH_3 + CO_2.$$

[1]) E. Friedmann, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 202, 1908.

[2]) E. Friedmann, l. c. S. 208. Die Angabe von Ringer und Frankel (Journ. of Biolog. Chem. 16, 563, 1914), daß die Formulierung des Vorganges von Spiro stammt, ist irrtümlich. Siehe den Literaturnachweis bei E. Friedmann, l. c. S. 204.

Diese Formulierung hat an Beweiskraft verloren, seitdem von Adam Loeb[1]) gezeigt worden ist, daß Essigsäure in der Leber von Hunden, die 24 Stunden gehungert haben, in Acetessigsäure übergeht, und der Acetaldehyd unter den Versuchsbedingungen der Durchströmungsexperimente, sei es durch Oxydation, sei es durch Cannizzarosche Umlagerung, zu Essigsäure umgewandelt werden kann. Es war dabei mit der Möglichkeit zu rechnen, daß die Bildung von Acetessigsäure nicht über die Zwischenstufe des Aldols, sondern über die Essigsäure verläuft. Gegen diese Möglichkeit könnte eingewendet werden, daß Acetaldehyd ein viel schwächerer Bildner von Acetessigsäure ist als die Essigsäure. Hält man diesen Einwand für berechtigt, so könnte man vielleicht doch aus dem Vergleich der nach Zusatz von Acetaldehyd gewonnenen Acetonwerte und der nach Zusatz von Essigsäure erhaltenen Zahlen für das pro Liter Blut neugebildete Aceton zu der Auffassung gelangen, daß der hier zutage tretende Unterschied möglicherweise in der Verschiedenheit des Weges, auf dem die Acetessigsäurebildung aus Acetaldehyd und aus Essigsäure verläuft, begründet ist. Hierzu kommt, daß der Vorgang der Aldolkondensation nach neueren Versuchen in recht ausgedehnter Weise im Tierkörper zur Geltung gelangt.

Unter diesen Umständen schien es von Interesse, das Verhalten des Acetaldehyds in der überlebenden, glykogenreichen Leber zu untersuchen und mit dem Verhalten der Essigsäure unter analogen Bedingungen zu vergleichen. Ich stellte daher Durchströmungsversuche der glykogenreichen Leber unter Zusatz von Aldehydammoniak an.

Die Technik der Versuche war die gleiche wie in den Versuchen, die ich unter Zusatz von Isovaleriansäure angestellt habe. Der Glykogengehalt der Leber wurde in einem vor der Durchblutung abgebundenen Leberlappen festgestellt.

Der verwendete Aldehydammoniak war aus unmittelbar vor der Durchblutung aus Paraldehyd destilliertem Aldehyd durch Einleiten von trockenem Ammoniak gewonnen.

Als Durchblutungsflüssigkeit diente ein Gemisch von 1400 ccm Rinderblut und 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung, die 2 g

---

[1]) Adam Loeb, diese Zeitschr. 46, 118, 1912.

Aldehydammoniak enthielt. Die Trennung von Aceton und Aldehyd wurde nach dem Verfahren von Masuda[1]) vorgenommen.

Die von mir bei der Durchblutung der glykogenreichen Leber unter Zusatz von Aldehydammoniak erhaltenen Resultate sind in der Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II.

Versuchs-Nr.	Gewicht des Hundes g	Gewicht der Leber g	Glykogengehalt der Leber %	Temperatur d. Blutes °C	Druck mmHg	Durchblutungs Zeit Min.	Durchblutungs Zahl	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons mg
5	4500	160	10,03	37—40	22—44	75	9	27,3
6	5800	230	12,24	35—39	22—40	91	15	39,7
7	5500	335	> 14,09[2])	37—38	22—26	76	11	33,9

Wie aus den Zahlen der Tabelle II hervorgeht, findet in der überlebenden, glykogenreichen Leber eine Bildung von Acetessigsäure aus Acetaldehyd nicht statt. Der Acetaldehyd verhält sich also in der überlebenden glykogenreichen Leber genau so wie die Essigsäure. Trotz dieses analogen Verhaltens möchten wir die Frage als offen bezeichnen, ob der Weg, der vom Acetaldehyd zur Acetessigsäure führt, über das Aldol oder über die Essigsäure führt.

In der Tabelle III stelle ich die Acetessigsäurebildner zusammen, deren Verhalten in der glykogenreichen Leber im Durchströmungsversuche bisher geprüft worden sind.

Tabelle III.

Untersuchte Substanz	Bildung von Acetessigsäure in der überlebenden, glykogenreichen Leber
Acetaldehyd	—
Essigsäure	—
Buttersäure	+
β-Oxybuttersäure . . .	+
Crotonsäure	+
Isovaleriansäure	+
n-Capronsäure	+

[1]) N. Masuda, diese Zeitschr. 45, 140, 1912.

[2]) Bei der Verseifung der wässerigen Glykogenlösung im Wasserbad sprang der Kolben. Ein geringer Teil der Glykogenlösung ging hierbei verloren.

Überblickt man diese Tabelle, so fällt in die Augen, daß allein die Acetessigsäurebildner, deren Übergang in Acetessigsäure nur auf dem Wege einer Synthese erfolgen kann, eine Abhängigkeit für diesen Vorgang von dem Glykogengehalt der Leber oder den Prozessen, die in der Leber zur Glykogenanreicherung führen, erkennen lassen, während alle anderen bisher geprüften Substanzen, so verschiedenartig auch ihre Beziehungen zu der gebildeten Acetessigsäure sind, unabhängig von den Prozessen, die zur Glykogenanreicherung in der Leber führen, Bildner von Acetessigsäure ebenso in der glykogenarmen wie in der glykogenreichen Leber sind.

Die mitgeteilten Versuche sind noch nach einer anderen Richtung von Interesse. Ringer und Frankel[1]) haben vor kurzem über Experimente berichtet, in denen sie Acetaldehyd an phlorizinvergiftete Hunde verfüttert haben. Sie geben an, daß drei Wirkungen des Acetaldehyds bei phlorizinvergifteten Hunden nachzuweisen sind: eine Herabsetzung der Stickstoffausscheidung, eine Vermehrung der Zuckerausscheidung und eine Herabsetzung der Ausscheidung von Aceton, Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure. Ihre Versuche führen nach ihrer Ansicht zu entgegengesetzten Schlußfolgerungen wie die Resultate von E. Friedmann.

Zur Erklärung dieses Gegensatzes diskutieren sie zwei Möglichkeiten.

Einmal mag der isolierte Stoffwechsel eines überlebenden Organes zu anderen Produkten führen als der Stoffwechselversuch, und zweitens besteht die Möglichkeit, daß die Bildung von Acetessigsäure aus Acetaldehyd in der überlebenden Leber abhängig ist von Ernährungsverhältnissen der Leber, etwa dem Vorhandensein oder dem Fehlen von Glykogen.

Durch die Versuche der vorliegenden Arbeit ist die Berechtigung der letzteren Annahme erwiesen, da in der Tat gezeigt werden konnte, daß die Bildung von Acetessigsäure in der überlebenden, glykogenreichen Leber ausbleibt. Trotzdem genügen diese Befunde nicht, um die abweichenden Ergebnisse, zu denen die Durchströmungsversuche von E. Friedmann und die Fütterungsversuche von Ringer und Frankel geführt haben, zu erklären,

[1]) A. J. Ringer und E. M. Frankel, Journ. of Biol. Chem. 16, 463, 1913.

da ja gerade bei der Leberdurchströmung von Hunden, die 24 Stunden gehungert haben, Acetaldehyd in Acetessigsäure übergeht. Es sind die Resultate dieser Versuche und nicht die an der glykogenreichen Leber ausgeführten Experimente, die die Kenntnis der Quellen der Acetonkörper erschlossen haben und zur Deutung der chemischen Vorgänge, die beim schweren Diabetiker zur Bildung von β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure führen, herangezogen worden sind.

Es darf nicht übersehen werden, daß die Beurteilung, ob und inwieweit eine Substanz im Stoffwechselversuch in β-Oxybuttersäure und Acetessigsäure übergeht, allein nach dem Resultate der Durchströmungsversuche doch recht unsicher ist. Sie mag vielleicht dann zulässig sein, wenn der Vergleich der quantitativen Verhältnisse zwischen dem Anteil der Substanz, die im Durchströmungsversuche verbraucht wird, und der Menge der neugebildeten Acetessigsäure ergeben würde, daß der Umfang dieser Reaktion erheblich genug ist, um zu der Annahme zu berechtigen, daß sie im intermediären Stoffwechsel eine Rolle spielen kann. Derartige Bestimmungen sind aber bisher nur in einem Falle ausgeführt worden[1]) und haben gerade für einen so kräftigen Bildner von Acetessigsäure, wie es die Essigsäure ist, ergeben, daß selbst in diesem Falle nur ein Bruchteil der im Durchströmungsversuche zerstörten Essigsäure durch die Neubildung von Acetessigsäure gedeckt wird. Da ferner der Stoffwechselversuch schon durch die quantitative Verteilung der in Reaktion tretenden Substanzen zu gänzlich anderen Reaktionsbedingungen führt als sie im Durchströmungsversuche vorliegen, so ist es wohl verständlich, daß Reaktionsmöglichkeiten, für die der Durchströmungsversuch erheblich bessere Bedingungen bietet als der Stoffwechselversuch, im Stoffwechselversuch zurücktreten, und umgekehrt. Der Durchströmungsversuch zeigt eben nur Möglichkeiten des chemischen Geschehens im Tierkörper, und es bleibt immer wieder dem direkten Versuche vorbehalten, festzustellen, ob die hier in Erscheinung tretenden oder andere Möglichkeiten im intermediären Stoffwechsel zur Geltung gelangen. Erst die Übereinstimmung der Durchströmungsversuche von Embden und seinen

[1]) Gustav Embden und Adam Loeb, l. c.

Mitarbeitern, mit den Stoffwechselversuchen von Baer und Blum[1]) am schweren Diabetiker hat den Nachweis erbracht, daß die im Durchströmungsversuche als Acetonbildner erkannten Substanzen tatsächlich im intermediären Stoffwechsel in weitem Umfange als Bildner von Acetessigsäure und β-Oxybuttersäure anzusprechen sind.

Diese Überlegungen führen dazu, in Übereinstimmung mit Ringer und Frankel anzunehmen, daß der isolierte Stoffwechsel der Leber zu anderen Produkten führen kann als der Stoffwechselversuch. In diesem Zusammenhange sei hervorgehoben, daß der Acetaldehyd nicht die einzige Substanz ist, die ein verschiedenes Verhalten im Stoffwechselversuch und im Durchströmungsversuch zeigt. Eine Zusammenstellung der hier in Betracht kommenden Beobachtungen soll demnächst im Anschluß an andere Versuche, die im hiesigen Laboratorium zurzeit im Gange sind, erfolgen.

---

[1]) Julius Baer und Leon Blum, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 55, 94, 1906.

Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper.

XXV. Mitteilung.

Verhalten der Malonsäure bei der Leberdurchblutung.

Von

Goro Momose.

(Aus dem Laboratorium der I. medizinischen Klinik der Kgl. Charité zu Berlin.)

(Eingegangen am 10. März 1914.)

Im Gegensatz zu der Fülle von Erfahrungen, die wir über den Abbau der Monocarbonsäuren der Fettsäuren besitzen, sind unsere Kenntnisse über den Abbau der Dicarbonsäuren im Tierkörper recht spärlich. Zwar haben die Versuche von Pohl[1]) ergeben, daß auch die Dicarbonsäuren, die Malonsäure, die Tartronsäure und die Mesoxalsäure in erheblichem Umfange im Tierkörper zerstört werden, aber die chemischen Vorgänge, die sich bei dem physiologischen Abbau dieser Säuren abspielen, sind unbekannt geblieben. Für die Bernsteinsäure dagegen ist durch Battelli und Stern[2]) gezeigt worden, daß sie durch Organfermente zu Äpfelsäure oxydiert wird, und es ist möglich, daß diese Reaktion den Weg des Abbaues der Bernsteinsäure im intermediären Stoffwechsel anzeigt.

Durch Versuche, die im Laboratorium von Embden ausgeführt worden sind, ist gezeigt worden, daß auch für die Dicarbonsäuren Beziehungen zu den Acetonkörpern vorhanden sind. So beobachtete J. Wirth[3]), daß Zuckersäure die Acet-

---

[1]) Julius Pohl, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 37, 413, 1896.

[2]) F. Battelli und L. Stern, diese Zeitschr. 30, 172, 1911.

[3]) Joseph Wirth, diese Zeitschr. 33, 49, 1911.

essigsäurebildung in der überlebenden Leber regelmäßig steigert, während die Wirkung der Gluconsäure und der Schleimsäure auf die Acetessigsäurebildung unsicher war, und K. Ohta[1]), der die Untersuchungen von Wirth fortsetzte, fand, daß d-Weinsäure, Traubensäure und Maleïnsäure Acetessigsäure zu bilden vermögen, während die Bernsteinsäure nur in einem Versuch zu einer Steigerung der Acetonbildung führte.

Auf Veranlassung von Herrn Prof. E. Friedmann habe ich das Anfangsglied dieser Reihe, die Malonsäure, auf ihr Verhalten im Durchströmungsversuche untersucht. Bei den nahen chemischen Beziehungen, die die Malonsäure zur Essigsäure aufweist, und unter Berücksichtigung der durch A. Loeb[2]) beobachteten Bildung von Acetessigsäure aus Essigsäure, interessierte es uns, zu untersuchen, ob auch für die Malonsäure ein Übergang in Acetessigsäure im Durchströmungsversuch nachzuweisen ist.

Ich führte die Durchblutung an Lebern von Hunden aus, die 24 Stunden gehungert hatten. Die Technik der Versuche war die übliche. Als Durchblutungsflüssigkeit diente ein Gemisch von 1400 ccm Rinderblut und 100 ccm physiologischer Kochsalzlösung, die 2 g Malonsäure mit Natronlauge neutralisiert enthielt. Unter Berücksichtigung der Beobachtungen von Masuda[3]) und Ohta[4]), die gefunden hatten, daß bei der Durchströmung der überlebenden Leber unter Zusatz von Dicarbonsäuren flüchtige, jodbindende Substanzen auftreten, die durch Kochen mit Silberoxyd nach dem Verfahren von Masuda[5]) zerstört werden, stellte ich die Menge der jodbindenden Substanzen vor und nach der Oxydation mit Silberoxyd des Destillates, das aus 500 ccm des nach der Enteiweißung nach Schenk geronnenen Filtrates stammte, fest.

Die bei der Leberdurchblutung unter Zusatz von Malonsäure erhaltenen Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

---

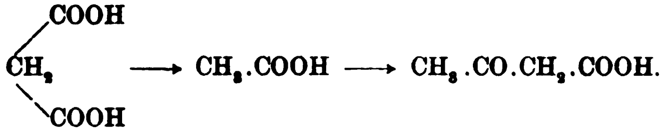
[1]) K. Ohta, diese Zeitschr. 45, 167, 1912.
[2]) Adam Loeb, diese Zeitschr. 46, 118, 1912.
[3]) N. Masuda, diese Zeitschr. 45, 150, 1912 (Tabelle III).
[4]) K. Ohta, l. c. S. 172.
[5]) N. Masuda, l. c. S. 140.

Durchblutungsversuche unter Zusatz von Malonsäure.

Nr. des Versuchs	Gewicht des Hundes g	Gewicht der Leber g	Durchblutungs- Zeit Min.	Durchblutungs- Zahl	Druck während der Durchblutung mm Hg	Verbrauchte $^{n}/_{10}$-Jodlösung a) von 500 ccm Filtrat *D* direkt destilliert ccm	Verbrauchte $^{n}/_{10}$-Jodlösung b) von 500 ccm Filtrat *D* nach Redestillation mit Ag_2O ccm	Menge des pro Liter Blut neugebildeten Acetons aus b) berechnet mg
1	3500	126	74	8	16—38	6,41	3,37	25,9
2	7000	163	76	16	28—24	8,40	6,18	68,4
3	6900	225	72	18	24	3,18	1,18	8,4
4	3000	91	85	4	34—66	3,43	1,63	13,0
5	3500	123	83	7	48—50	4,13	2,88	25,7
6	5800	129	77	10	28—32	7,10	5,10	52,7
7	3000	106	88	8	34—48	4,84	3,10	28,0
8	9000	239	77	15	22	4,69	2,80	22,3
9	9000	131	76	13	22	4,27	2,58	19,6

Die 9 Versuche, die ich unter Zusatz von Malonsäure zum Durchblutungsblute ausgeführt habe, zeigen übereinstimmend, daß bei der Durchblutung mit Malonsäure nicht unbeträchtliche Mengen einer jodbindenden, flüchtigen Substanz entstehen, die durch Silberoxyd zerstört wird und demnach kein Aceton ist. Über die Natur dieser Substanz bin ich zu keinem abschließenden Urteil gekommen.

Die nach dem Verfahren von Masuda ermittelten Acetonwerte ergeben nur in 2 Versuchen (Versuch 2 und 6) eine Steigerung des pro Liter Blut neugebildeten Acetons. In diesen beiden Versuchen liegt die Möglichkeit vor, daß das neugebildete Aceton aus der der Durchströmungsflüssigkeit zugesetzten Malonsäure herrührt. Sollte diese Annahme zutreffend sein, so könnte man diesen Übergang von Malonsäure in Acetessigsäure durch das intermediäre Auftreten von Essigsäure deuten:



$$CH_2(COOH)_2 \longrightarrow CH_3.COOH \longrightarrow CH_3.CO.CH_2.COOH.$$

Immerhin bieten diese beiden positiv ausgefallenen Versuche einen Hinweis, daß auch intermediär auftretende Essigsäure in Acetessigsäure übergehen kann, ein Hinweis, der in Anbetracht der Rolle, die die Essigsäure im Sinne der typischen β-Oxydation beim Abbau der Fettsäuren spielt, Beachtung beansprucht.

Zur Biochemie der Strahlenwirkungen. I.

Über die Art der Beziehungen zwischen der Wirkung mineralischer Katalysatoren und fluorescierender Farbstoffe.

Von

C. Neuberg und A. Galambos[1]).

(Aus der chemischen Abteilung des Kgl. tierphysiologischen Instituts in Berlin und aus der chemischen Abteilung des Kaiser-Wilhelm-Instituts für experimentelle Therapie in Dahlem.)

In früheren Mitteilungen über diesen Gegenstand[2]) hat der eine von uns wiederholt darauf hingewiesen, daß, abgesehen von den bekannten photochemischen Reaktionen der Silberverbindungen, die meisten lichtchemischen Vorgänge sehr langsam verlaufen und oft Jahr und Tag zu ihrer Vollendung brauchen.

Da sich die verschiedenen bekannten photobiologischen Prozesse mit beträchtlicher Schnelligkeit abspielen, so bestand hier ein innerer Widerspruch, wenn man die lichtbiologischen und lichtchemischen Vorgänge nicht als prinzipiell verschieden betrachten wollte.

Dem Bestreben, die Kluft zu überbrücken, entsprangen die Versuche Neubergs, die darauf abzielten, Katalysatoren für die Beschleunigung biochemisch wichtiger Lichtreaktionen ausfindig zu machen. Eine Reihe von Untersuchungen[2]) haben dann dargetan, daß man in Uran- und Eisenverbindungen höchst wirksame, in Mangansalzen schwächere

---

[1]) Die vorliegende Mitteilung umfaßt Versuche, die im Wintersemester 1912/13 im Kgl. Tierphysiologischen Institut ausgeführt worden sind (S. 315—326); dieselben sind dann neuerdings in der S. 327 bis 331 angegebenen Richtung ergänzt.

[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 305, 1908; 17, 270, 1909; 27, 271, 1910; 29, 279, 1910; 39, 158, 1912; 44, 495, 1912.

Katalysatoren dieser Art besitzt. Dabei wird der Effekt der Uranverbindungen, der in vereinzelten und als Kuriosa betrachteten Fällen seit alters bekannt war, von Eisensalzen übertroffen. Ferner zeigte sich, daß die Derivate beider Metalle eine ganz universelle Wirkung auf alle wichtigen Bausteine der pflanzlichen und tierischen Leibessubstanzen entfalten.

Weiterhin ergab sich die in biologischer Hinsicht bedeutungsvolle Tatsache, daß die Sonnenstrahlung und selbst das diffuse Tageslicht die photochemischen Effekte unter dem Einfluß jener metallischen Katalysatoren kräftig herbeiführen und dabei die an sich ganz lichtunempfindlichen Systeme ausgesprochen photosensibel machen. Künstliche Strahlenquellen mit einem Wirkungsbereich im Ultraviolett, das in der Natur nicht vorkommt, sind dazu nicht erforderlich. Der Umstand schließlich, daß selbst minimale Eisenmengen[1]) eine weitgehende photokatalytische Wirkung entfalten, weist auf die Möglichkeit hin, daß die ubiquitär auftretenden Ferro- und Ferriionen in der Natur eine Übertragung von Lichtenergie vermitteln.

Das Gemeinsame in der Wirkung der metallischen Lichtkatalysatoren darf man wohl in ihrer Fähigkeit suchen, in verschiedenen Oxydationsstufen aufzutreten. Einerlei von welchem Wertigkeitsgrad man ausgeht, der photokatalytische Effekt stellt sich ein, wenn Luftsauerstoff zugegen ist. Das Licht bewirkt die ständige Bildung von Oxydul $\rightleftarrows$ Oxyd in dem betreffenden System. Der bei der Reduktion disponibel werdende Sauerstoff wird auf das Substrat übertragen, das dadurch in mannigfacher Hinsicht oxydiert und gespalten werden kann. Die Vorgänge sind Lichtreaktionen, da sie im Dunkeln ausbleiben, sie sind katalytische, da die Quantität der Umwandlungsprodukte in keinem stöchiometrischen Verhältnis zu der zugefügten Metallsalzmenge steht.

Nachdem so für das Verständnis bestimmter biochemischer Lichtreaktionen eine Grundlage geschaffen war, lag es nahe, in ähnlicher Weise den Mechanismus anderer photobiologischer Prozesse zu prüfen. Experimentell am bequemsten zugänglich erschien das bedeutsame Gebiet der photodynamischen Er-

---

[1]) C. Neuberg, Zeitschr. f. Balneologie 5, 561, 1912.

scheinungen, das H. v. Tappeiner insbesondere in Gemeinschaft mit A. Jodlbauer erschlossen hat. Hier handelt es sich um den Vorgang, daß bestimmte fluorescierende Farbstoffe in einer an sich im Dunkeln unschädlichen Konzentration, im Hellen auf Protozoen, Bakterien und auch höher entwickelte Organismen sowie auf gewisse Produkte der Lebewesen, wie Enzyme und Immunkörper, vernichtend oder schwächend wirken (Photodynamie).

Diese kombinierte Wirkung von Licht und Farbstoffen kommt relativ schnell zustande. Es ist also wohl anzunehmen, daß dabei in der Leibessubstanz oder in dem kompliziert zusammengesetztem Substrat der Ferment- und Immunstoffe sich irgendwelche chemischen Reaktionen abspielen.

Wie man sieht, haben bei diesen photodynamischen Erscheinungen die Farbstoffe eine ähnliche Funktion wie die Metallsalze bei den einfachen photokatalytischen Prozessen.

Der erste Versuch, beide Substanzgruppen auf Grund chemischer Leistungen miteinander zu vergleichen, hatte keinerlei Erfolg[1]). C. Neuberg wählte auf Grund einer Mitteilung von A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner[2]) das Fluorescein, das die genannten Autoren als einen recht wirksamen Sensibilisator für die chemische Umsetzung bei der Ederschen Reaktion empfohlen hatten. Allein das Fluorescein brachte unter den Bedingungen, wo Uran- und Eisensalze höchst kräftig wirkten, keine photokatalytischen Reaktionen im Reagensglase hervor.

Später zeigte Raymond F. Bacon[3]), daß ein Zerfall der Oxalsäure, wie ihn Uransalze bekanntlich mit großer Leichtigkeit zuwege bringen, mit Fluorescein und Eosin nicht erfolgt.

v. Tappeiner hat stets die Fluorescenz der verwendeten Farbstoffe als ein unbedingtes Erfordernis für das Zustandekommen der photodynamischen Erscheinungen bezeichnet und die Frage angeregt[4]), ob nicht auch bei den mineralischen Katalysatoren Neubergs die Fluorescenz eine Vorbedingung für die Wirksamkeit sei.

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 313, 1908.

[2]) A. Jodlbauer u. H. v. Tappeiner, Ber. 38, 2607 u. 2608, 1905.

[3]) Raymond F. Bacon, The Philippine Journ. of Science 5, 281, 1910; vgl. Ch. C. 11, I, 620.

[4]) H. v. Tappeiner, Ergebn. d. Physiol. 8, 718, 1909.

Es kann nun gar keinem Zweifel unterliegen, daß die Fluorescenz einer verdünnten, wässerigen Uransulfatlösung[1]) oder gar einer Ferro- oder Ferrisulfatlösung, soweit überhaupt vorhanden, von einer ganz anderen Größenordnung ist als die Fluorescenz der photodynamisch wirksamen Farbstoffe. Wenn die Fluorescenz ganz allgemein so eng mit den photochemischen Prozessen zusammenhängen würde, so wäre a priori zu erwarten, daß die stärksten Fluorescenzerreger auch die kräftigsten Lichtkatalysatoren seien. Obgleich das Fluorescein nach Jodlbauers und v. Tappeiners eigenen Angaben (l. c.) für die Edersche Reaktion einen sehr wirksamen Sensibilisator darstellt, will v. Tappeiner[2]) im Ausbleiben chemischer Spaltungen und Oxydationen unter dem Einflusse des Fluoresceins keinen Beweis gegen die Theorie der Fluorescenzbedeutung erblicken, da Fluorescein in seinem Einfluß auf biologische Substrate von anderen Farbstoffen übertroffen wird[3]).

Nun hatten schon zugleich mit den Fluoresceinversuchen von uns angestellte Experimente mit Methylenblau und Rose bengale gezeigt, daß auch diese Farbstoffe im Sonnenlicht keine chemischen Reaktionen analog den Eisensalzen auslösen. Da Methylenblau und Rose bengale zu den wirksamsten Erregern der Photodynamie von v. Tappeiner gezählt werden und sich in seinen Versuchen vielfach als solche erwiesen haben, so ist es klar, daß ein offenbarer Widerspruch besteht zwischen den Ergebnissen der chemischen Versuche in vitro und denen der biologischen Experimente mit fluorescierenden Farbstoffen.

Obgleich diese Umstände die ausschlaggebende Bedeutung der Fluorescenz als sehr zweifelhaft erscheinen ließen, haben wir noch eine größere Reihe der photodynamisch erprobten Farbstoffe auf ihren chemischen Effekt geprüft und die früheren diesbezüglichen Versuche wiederholt.

Aus der Reihe der von v. Tappeiner und Jodlbauer

---

[1]) Die Fluorescenz fester Uranverbindungen ist bekannt.

[2]) H. v. Tappeiner, l. c.

[3]) Schon S. 317 ist erwähnt, daß selbst die so leicht eintretende Photolyse der Oxalsäure auch durch Eosin nicht ausgelöst wird. Eosin wird aber von v. Tappeiner als ein stark wirksamer Erreger der Photodynamie bezeichnet.

für biologische Zwecke verwendeten Farbstoffe und Chromophore haben wir folgende für die chemischen Versuche herausgegriffen:

1. Fluoresceingruppe:
   Fluorescein, Eosin, Erythrosin, Rose bengale.
2. Rhodamingruppe:
   Rhodamin B.
3. Anthracengruppe:
   2,7-Anthrachinondisulfosäure,
   9,10-Dichloranthracen-2,7-disulfosäure.
4. Acridingruppe:
   Acridinhydrochlorid,
   Chrysanilinhydrochlorid.
5. Triphenylmethanfarbstoffe:
   Rosanilinchlorhydrat,
   Malachitgrün,
   Methylgrün,
   Methylviolett.
6. Äthylrot.
7. Nigrosin.
8. Äsculin.

Diese 8 Gruppen umfassen Stoffe, deren photodynamische Wirksamkeit im biologischen Experiment alle Abstufungen von höchster Intensität bis herab zu 0 aufweist.

Im Reagensglasversuch erwiesen sich selbst bei vieltägiger Bestrahlung alle — bis auf die Gruppe der Anthracenderivate — photokatalytisch als unwirksam.

Inzwischen sind wir durch die große Liebenswürdigkeit der Herren v. Tappeiner und Jodlbauer in den Besitz eines Sonderabdruckes[1]) gelangt, aus dem hervorgeht, daß die Münchener Autoren selbst zu fast den gleichen experimentellen Resultaten wie wir gekommen sind.

---

[1]) A. Jodlbauer und H. v. Tappeiner, Zusammenfassende Darstellung des Inhalts dreier Dissertationen. Die Strahlentherapie 2, 84, 1913.

Unsere Versuche[1]) umfassen eine größere Anzahl von Farbstoffen[2]), und die Auswahl der Substrate ist eine ziemlich reichhaltige[3]). Auf Grund unserer Experimente, die sich teilweise auch in anderer Richtung bewegen, gelangen wir bezüglich der theoretischen Deduktionen zu ganz anderen Folgerungen als v. Tappeiner und Jodlbauer.

Unsere Versuchsanordnung für die chemische Prüfung entsprach ganz der, wie sie Neuberg früher für die photokatalytischen Versuche mit Eisen- und Uransalzen gewählt hatte und die auch Jodlbauer und v. Tappeiner übernommen haben.

Die Farbstoffe kamen in möglichst neutraler Lösung (die sauren als Natriumsalze, die basischen als Chlorhydrate) zur Anwendung, und zwar in der Regel in 1%igen und 0,1%igen Lösungen[4]).

Zu den orientierenden Versuchen dienten die auch früher von uns als Substrate benutzten Substanzen Glycerin, d-Weinsäure und d,l-Alanin, die bis zu dem Gehalt von 1% den Farbstofflösungen zugesetzt wurden.

Als Lichtquelle verwendeten wir teils Sonnen- bzw. Tageslicht, teils eine Heraeussche Quecksilber-Quarzlampe. Die Bestrahlung geschah sowohl in Gefäßen aus Glas als in solchen aus Quarz.

Ein Eintritt der Reaktion gab sich bei Glycerin und bei d-Weinsäure durch die Umwandlung in reduzierende Substanzen zu erkennen (Probe mit Fehlingscher Mischung), bei d,l-Alanin durch die Abspaltung von Ammoniak.

---

[1]) Dieselben sind früher angekündigt (diese Zeitschr. **29**, 293, 1910) und zum Teil im September 1912 mitgeteilt; vgl. C. Neuberg, Beziehungen des Lebens zum Licht. Mongr. Berlin 1913. Vortrag, gehalten vor der Mitgliederversammlung der Deutschen Zentralstelle für Balneologie im September **1912** zu Schwerin.

[2]) Für die Überlassung der Farbstoffe sind wir der Badischen Anilin- und Sodafabrik, den Elberfelder und Höchster Farbwerken zu ganz besonderem Dank verpflichtet.

[3]) v. Tappeiner und Jodlbauer haben Eosin, Rose bengale, Methylenblau, Acridin, γ-Phenylchinaldin, Resorufin, Dichloranthracendisulfosäure sowie Anthrachinondisulfosäure verwendet und auf Glycerin, Weinsäure und Alanin einwirken lassen.

[4]) Zu ihrer Herstellung ist stets frisch destilliertes Wasser genommen, um Spuren mineralischer Katalysatoren tunlichst auszuschließen.

A.

Belichtungsdauer: 13 Tage	1%ige Farbstofflösungen in ihrer Wirkung bei Tageslicht auf:		
	Glycerin	d-Weinsäure	d, l-Alanin
Fluorescein	—	—	—
Eosin	—	—	—
Erythrosin	—	—	—
Rose bengale	—	—	—
Rhodamin B	—	—	—
2,7-anthrachinondisulfos. Natrium	+[1])	+[1])	+
9,10-dichloranthracen-2,7-disulfos. Natrium	+[1])	+[1])	+
Acridinhydrochlorid	—	—	—
Chrysanilinhydrochlorid	—	—	—
Rosanilinchlorhydrat	—	—	—
Malachitgrün	—	—	—
Methylgrün	—	—	—
Methylviolett	—	—	—
Äthylrot	—	—	—
Nigrosin	—	—	—
Äsculin	+	+	—

B.

Belichtungsdauer: 5 Tage	0,1%ige Farbstofflösungen in ihrer Wirkung bei Tageslicht auf:		
	Glycerin	Weinsäure	Alanin
Fluorescein	—	—	—
Eosin	—	—	—
Erythrosin	—	—	—
Rose bengale	—	—	—
Rhodamin B	—	—	—
2,7-anthrachinondisulfos. Natrium	+[1]	+[1])	+
9,10-dichloranthracen-2,7-disulfos. Natrium	+[1])	+[1])	+
Acridinhydrochlorid	—	—	—
Chrysanilinhydrochlorid	—	—	—
Rosanilinchlorhydrat	—	—	—
Malachitgrün	—	—	—
Methylgrün	—	—	—
Methylviolett	—	—	—
Äthylrot	—	—	—
Nigrosin	—	—	—
Äsculin	+	+	—

[1]) Bereits nach $1\frac{1}{2}$ Tagen Reduktion von Fehlingscher Mischung in der Kälte.

C.

Bestrahlungsdauer: 50 Stunden	1 %ige Farbstofflösungen in ihrer Wirkung beim Licht der Quarzlampe auf:		
	Glycerin	Weinsäure	Alanin
Fluorescein	—	—	—
Eosin	—	—	—
Erythrosin	—	—	—
Rose bengale	—	—	—
Rhodamin B	—	—	—
2,7-anthrachinondisulfos. Natrium	+	+	+
9,10-dichloranthracen-2,7-disulfos. Natrium	+	+	+
Acridinhydrochlorid	—	—	—
Chrysanilinhydrochlorid	—	—	—
Rosanilinchlorhydrat	—	—	—
Malachitgrün	—	—	—
Methylgrün	—	—	—
Methylviolett	—	—	—
Äthylrot	—	—	—
Nigrosin	—	—	—
Äsculin	+	+	Spur

D.

Bestrahlungsdauer: 50 Stunden	0,1 %ige Farbstofflösungen in ihrer Wirkung beim Licht der Quarzlampe auf:		
	Glycerin	Weinsäure	Alanin
Fluorescein	—	—	—
Eosin	—	—	—
Erythrosin	—	—	—
Rose bengale	—	—	—
Rhodamin B	—	—	—
2,7-anthrachinondisulfos. Natrium	+	+	+
9,10-dichloranthracen-2,7-disulfos. Natrium	+	+	+
Acridinhydrochlorid	—	—	—
Chrysanilinhydrochlorid	—	—	—
Rosanilinchlorhydrat	—	—	—
Malachitgrün	—	—	—
Methylgrün	—	—	—
Methylviolett	—	—	—
Äthylrot	—	—	—
Nigrosin	—	—	—
Äsculin	+	+	—

Es fällt zunächst auf, daß die wirksam befundenen Substanzen gar nicht zu den eigentlichen Farbstoffen gehören, sie teilen vielmehr mit diesen nur den Charakter als Chromophore oder als Fluorophore.

Als notwendige Kontrollen wurden die drei Verbindungen mit den Substraten zusammen im Dunkeln belassen. Es trat keine Umwandlung ein. Weiter wurden ihre Lösungen für sich, ohne Zugabe von Glycerin, d-Weinsäure und d, l-Alanin belichtet. Dabei ergab sich, daß die Äsculinlösungen allein ein Reduktionsvermögen erlangen, was bei der Glucosidnatur dieses Körpers leicht verständlich ist. Da überdies Äsculin bei der Einwirkung auf Alanin im Licht nicht deutlich Ammoniak in Freiheit setzte und auch aus d-Weinsäure im Gegensatz zu den Anthracenderivaten nicht die charakteristische Ketosäure (Naphthoresorcinprobe!) erzeugte, so scheidet auch diese Substanz aus.

Auf Grund dieser Feststellungen haben wir sodann geprüft, ob die Wirksamkeit der beiden Säurederivate des Anthracens sich nicht nur auf Glycerin, d-Weinsäure und d, l-Alanin beschränkt, sondern sich auch anderen Stoffen gegenüber geltend macht.

E.

Umwandlungen verschiedener Substanzen im Licht bei Gegenwart von dichloranthracendisulfosaurem Natrium.

Nr.	Ausgangsmaterial	Natur oder Eigenschaften der umgewandelten Lösung
1	Adonit	Reduktion von Fehlingscher Mischung; positive Orcinprobe.
2	Mannit	do.
3	Quercit	do.
4	m-Inosit	do.
5	Benzylalkohol	Starker Geruch nach Benzaldehyd; Bildung von Benzaldehydphenylhydrazon.
6	Glykolsäure	Reduktion von Fehlingscher Mischung, sehr stark von Silberlösung, Formaldehyd.
7	d, l-Glycerinsäure	Reduktion von Fehlingscher Mischung schon in der Kälte.
8	l-Äpfelsäure	Reduktion von ammoniakalisch-alkal. Silberlösung (schwach).
9	Citronensäure	do.
10	d-Glucoheptonsäure . . .	Reduktion von Fehlingscher Mischung.
11	l-Arabinose	Reduktion v. Fehlingscher Mischung schon in der Kälte; Oson.
12	l-Xylose	do.
13	d-Glucose	do.
14	Maltose	do.
15	Milchzucker	do.
16	Raffinose	do.
17	Inulin	do.
18	Stärke	do.
19	Glykogen	do.
20	α-Methylglucosid	do.
21	Amygdalin	Reduktion von Fehlingscher Mischung; starker Geruch nach bitteren Mandeln.
22	Mentholglucuronsäure . .	Reduktion von Fehlingscher Mischung; Geruch nach Menthol.

Nr.	Ausgangsmaterial	Natur oder Eigenschaften der umgewandelten Lösung
23	d, l-Leucin	Reduktion von alkalischer Silberlösung; schwacher Geruch nach Valeraldehyd; NH_3-Abspaltung.
24	l-Asparaginsäure	Reduktion von alkalischer Silberlösung; NH_3-Abspaltung.
25	d-Glutaminsäure	do.
26	d, l-Serin	Reduktion von Fehlingscher Mischung; NH_3-Abspaltung.
27	d, l-Isoserin	do.
28	Seidenfibroinpepton . . .	Reduktion von alkalischer Silberlösung; NH_3-Abspaltung.
29	Witte-Pepton (Albumosen)	do.
30	d-Glucosaminchlorhydrat	Reduktion von Fehlingscher Mischung in der Kälte (Oson?).
31	Glycerinphosphorsaures Natrium	Verstärkte Abspaltung von Phosphorsäure; Bildung reduzierender Substanz.
32	Phytinnatrium	do.
33	Chondroitinschwefelsaures Natrium	Schwache Abspaltung von Schwefelsäure; Bildung reduzierender Substanz.
34	Saccharosephosphorsaures Calcium	Abspaltung von Phosphorsäure; Bildung reduz. Substanzen.
35	HefenucleinsauresNatrium	Abspaltung von Phosphorsäure und Ammoniak; Reduktion von alkalischer Silberlösung.

F.

Umwandlungen verschiedener Substanzen im Licht bei Gegenwart von anthrachinondisulfosaurem Natrium.

Nr.	Ausgangsmaterial	Natur oder Eigenschaften der umgewandelten Lösung
1	Adonit	Reduktion von Fehlingscher Mischung; positive Orcinreaktion; Bildung von Pentosazon.
2	Mannit	Reduktion v. Fehlingscher Mischung; Bildung v. Glucosazon.
3	Quercit	Reduktion von Fehlingscher Mischung schon in der Kälte.
4	m-Inosit	do.
5	Benzylalkohol	Starker Geruch nach Benzaldehyd; Bildung von Benzaldehydphenylhydrazon.
6	Glykolsäure	Reduktion von alkalischer Silberlösung schon in der Kälte.
7	d, l-Glycerinsäure	Reduktion von Fehlingscher Mischung schon in der Kälte.
8	l-Äpfelsäure	Reduktion von alkalischer Silberlösung schon in der Kälte.
9	Citronensäure	do.
10	d-Glucoheptonsäure . . .	Reduktion von Felingscher Mischung (sehr stark).
11	l-Arabinose	Reduktion v. Fehlingscher Mischung schon in d. Kälte; Oson.
12	l-Xylose	do.
13	d-Glucose	do.
14	Maltose	Reduktion von Fehlingscher Mischung schon in der Kälte.
15	Milchzucker	do.
16	Raffinose	do.
17	Inulin	do.
18	Stärke	Reduktion von Fehlingscher Mischung; Glucosazonbildung.
19	Glykogen	do.
20	α-Methylglucosid	Reduktion von Fehlingscher Mischung.
21	Amygdalin	Reduktion von Fehlingscher Mischung; starker Geruch nach bitteren Mandeln.

Nr.	Ausgangsmaterial	Natur oder Eigenschaften der umgewandelten Lösung
22	Mentholglucuronsäure . .	Reduktion von Fehlingscher Mischung schon in der Kälte; Geruch nach Menthol.
23	d, l-Leucin	Starke Reduktion von alkalischer Silberlösung; NH_3-Abspaltung; Geruch nach Isovaleraldehyd.
24	l-Asparaginsäure	Starke Reduktion von alkal. Silberlösung; NH_3-Abspaltung.
25	d-Glutaminsäure	do.
26	d, l-Serin	Reduktion von Fehlingscher Mischung in der Kälte; NH_3-Abspaltung.
27	d, l-Isoserin	Reduktion von Fehlingscher Mischung in der Kälte.
28	Seidenfibroinpepton . . .	Reduktion von alkalischer Silberlösung; NH_3-Abspaltung.
29	Witte-Pepton (Albumosen)	do.
30	d-Glucosaminchlorhydrat	Reduktion von Fehlingscher Mischung in der Kälte.
31	Glycerinphosphorsaures Natrium	Reduktion von Fehlingscher Mischung in der Kälte; positive Orcinprobe; Abspaltung von H_3PO_4.
32	Phytinnatrium	Abspaltung von Phosphorsäure; Bildung reduz. Substanz.
33	Chondroitinschwefelsaures Natrium	Reduktion von Fehlingscher Lösung; schwache Abspaltung von Schwefelsäure.
34	Saccharosephosphorsaures Calcium	Abspaltung von Phosphorsäure. Reduktion von Fehlingscher Mischung.
35	HefenucleinsauresNatrium	Loslösung von Phosphorsäure; Reduktion von alkalischer Silberlösung; Abspaltung von NH_3.

Die Wirkung der beiden Anthracenabkömmlinge ist, wie ersichtlich, eine vielseitige und weitgehende. Die Effekte stehen hinter denen der mineralischen Katalysatoren, wie wir sie früher eingehend beschrieben haben, kaum zurück und sind ihnen wesensgleich.

Auch in quantitativer Beziehung ist die Umwandlung durch die kombinierte Einwirkung von Licht und Anthracenderivaten eine beträchtliche.

Untersucht wurden d-Weinsäure (als Kalium-Natriumtartrat), Glycerin, Glykokoll und Seidenfibroinpepton. Bei den beiden ersten stellt sich Reduktionsvermögen für Fehlingsche Mischung[1]) ein; das aus ihr abgeschiedene Kupferoxydul ist als CuO zur Wägung gebracht. Aus den beiden letztgenannten Verbindungen wird Ammoniak in Freiheit gesetzt; es ist als NH_3 bestimmt worden.

[1]) Aus dem Glycerin entsteht Glycerose (Orcinprobe), aus der Weinsäure neben Carbonylsäuren übrigens auch Acetaldehyd sowie Alkalicarbonat (s. S. 328).

A.

In 100 ccm 0,5 %igem dichlor-anthracendisulfosaurem Natrium gelöst:	Belichtungsdauer Std.	Gesamtmenge d. Umwandlungsprodukts, ausgedrückt in der zur Wägung oder Titration gebrachten Bestimmungsform
1,000 g d-weinsaures Kalium-Natrium	48	0,025 g CuO
1,000 g Glycerin	48	0,100 g CuO
1,000 g d, l-Glykokoll	60	0,003 g NH_3
1,000 g Seidenfibroinpepton	60	0,004 g NH_3

B.

In 100 ccm 0,5 %igem anthrachinondisulfosaurem Natrium gelöst:	Belichtungsdauer Std.	Gesamtmenge d. Umwandlungsprodukts, ausgedrückt in der zur Wägung oder Titration gebrachten Bestimmungsform
1,000 g d-weinsaures Kalium-Natrium	65	0,134 g CuO
1,000 g Glycerin	65	0,192 g CuO
1,000 g Glykokoll	60	0,004 g NH_3
1,000 g Seidenfibroinpepton	60	0,004 g NH_3

Wir haben die Versuche mit den Anthracenderivaten so ausführlich mitgeteilt, weil sie unserer Meinung nach vielleicht Grundlagen für das Verständnis der photodynamischen Erscheinungen in chemischer Hinsicht abgeben können.

Wie zuvor auseinander gesetzt ist, versagt die Fluorescenztheorie. Denn die sowohl am stärksten fluorescierenden als im biologischen Experiment kräftigsten Farbstoffe lassen in vitro bei der Einwirkung auf rein chemische Substrate jeden Effekt auch bei vieltägiger Einwirkung vermissen. Die Anthracenderivate gleichen dagegen den wirksamen anorganischen Lichtkatalysatoren sehr weitgehend.

Genau wie man bei diesen die von uns früher beschriebenen photokatalytischen Wirkungen auf den stetigen Wechsel der Oxydationsstufe, d. h. auf den gegenseitigen Übergang von Oxydul $\underset{\longleftarrow}{\overset{\longrightarrow}{\text{in}}}$ Oxyd, zurückführen konnte, darf man wohl eine ganz entsprechende Annahme für die Anthracenderivate machen. Die Grundsubstanz der 2,7-Anthrachinondisulfosäure, das An-

thrachinon, ist ausgezeichnet durch die leichte Überführbarkeit in das **Anthrahydrochinon**, das 9,10-Dioxyanthracen, das bereits an der Luft sich wieder zu Anthrachinon oxydiert. In dem Spiel zwischen Anthrachinon und Anthrahydrochinon

CO C(OH)

⇄

CO C(OH)

liegt nun ein ganz entsprechender Wechsel der Oxydationsstufen vor, wie beim gegenseitigen Übergang von Ferri- in Ferro- oder von Urani- in Urano-Verbindungen.

Sehr ähnlich liegen die Verhältnisse bei dem Stammkörper der 9,10-Dichlor-2,7-anthracendisulfosäure, dem **9,10-Dichloranthracen.**

Als Meso-Anthracenabkömmling

CCl

CCl

besitzt es große Neigung zum Übergang in Derivate des Anthrachinons.

Eigens angestellte Versuche haben nun tatsächlich ergeben, daß beide **Anthracenderivate bei der Belichtung charakteristische Veränderungen** erfahren, die die geäußerten Anschauungen stützen.

	Reaktionen einer nicht bestrahlten 1 ‰igen Lösung von	
	9,10-dichloranthracen-2,7-disulfosaurem Natrium	anthrachinon-2,7-disulfosaurem Natrium
$BaCl_2$	in HCl lösliche Fällung	schwache Trübung
NaOH	gelblich	farblos
$AgNO_3$	keine Fällung in verdünnter salpetersaurer Lösung	—
Farbe	hellgelb, stark bläuliche Fluorescenz	farblos

	Reaktionen einer von der Quarzlampe bestrahlten $1^{0}/_{00}$igen Lösung von			
	9,10-dichloranthracen-2,7-disulfosaurem Natrium		anthrachinon-2,7-disulfosaurem Natrium	
	Belichtungsdauer		Belichtungsdauer	
	10 Std.	30 Std.	10 Std.	30 Std.
$BaCl_2$	Trübung in salzsaurer Lsg.	H_2SO_4-Abspaltung	Trübung	stärkere Trübung
NaOH	violett	violett	violett	tiefrot-violett
$AgNO_3$	Cl-Abspaltung	starke Cl-Abspaltung	—	—
Farbe	tiefgelb, schwach fluorescierend	braun, Fluorescenz verschwunden	gelb	gelbbraun

Nimmt man die Bestrahlung beider Lösungen von Anthracenabkömmlingen in Gegenwart eines organischen Substrates, wie Glycerin, Seignettesalz oder Seidenfibroinpepton, in offenen Gefäßen vor, so erhält man die in den voraufgehenden tabellarischen Übersichten aufgeführten Umwandlungen der Zusätze. Daneben treten auch alle die soeben erwähnten Veränderungen der Anthracenderivate ein, bis auf die charakteristische Farbenreaktion mit Lauge[1]). Weder KOH, NaOH noch NH_4OH rufen jetzt die Violettfärbung hervor. Dieses Verhalten deutet darauf hin, daß die entsprechende Gruppe in Anwesenheit der Substrate nicht beständig ist.

Ob in den sich mit Lauge violett färbenden Substanzen ein Anthrahydrochinonabkömmling vorliegt, ist nicht entschieden; es sind auch andere Zwischenstufen denkbar, die sich vom

$$\text{Oxanthron } C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CHOH\\CO\end{matrix}\right\rangle C_6H_4,$$

$$\text{Anthron } C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CH_2\\CO\end{matrix}\right\rangle C_6H_4,$$

$$\text{Anthranol } C_6H_4\left\langle\begin{matrix}CH\\ |\\C(OH)\end{matrix}\right\rangle C_6H_4 \text{ usw.}$$

---

[1]) Seignettesalzlösung, die für sich bestrahlt höchstens schwach alkalisch wird, nimmt bei Belichtung in Gegenwart der beiden Anthracenabkömmlinge eine intensiv alkalische Reaktion an (gegen Lackmus wie Phenolphthalein). Die Anthracenderivate allein werden schwach sauer. Diese Art der Alkalibildung aus neutralen Salzen soll weiter verfolgt

ableiten. Auch die dimolekularen Anthracenderivate, die sich nach Orndorff und Bliß[1]), Dimroth[2]), Luther und Weigert[3]), H. Meyer, Bondy und Eckert[4]) leicht im Licht bilden, sind in Betracht zu ziehen.

Prinzipiell liegt stets das System Peroxyd $\rightleftarrows$ Suboxyd vor[5]).

Nun kann man der Mehrzahl aller Farbstoffe eine Chinonstruktur erteilen, der eine entsprechende Hydrochinonform zugehört. Es wäre denkbar, daß diejenigen Photodynamieerreger, die auf chemische Körper im Reagensglase unwirksam sind, bei der Berührung mit biologischen Substraten auf solche Atomgruppierungen treffen, die labil genug sind, um im Lichte eine Reaktion nach dem Schema Oxyd $\rightleftarrows$ Oxydul zu ermöglichen[6]), d. h. als Lichtreceptoren zu fungieren[7]).

---

werden. Obgleich also im Falle des Kalium-Natriumtartrats dauernd alkalische Reaktion besteht, ist nie eine Violettfärbung während der Belichtung zu bemerken gewesen.

[1]) Orndorff und Bliß, Amer. chem. Journ. 18, 455, 1896.

[2]) O. Dimroth, Ber. 34, 219, 1901.

[3]) Luther und Weigert, Zeitschr. f. physik. Chem. 53, 385, 1905.

[4]) H. Meyer, R. Bondy und A. Eckert, Chem. Centralbl. 13, I, 1030.

[5]) Es sei auch darauf hingewiesen, daß bei der Oxydation von Anthrachinonderivaten und von anderen chinoiden Stoffen nach W. Manchot (Ann. 314, 177, 1901; 316, 318, 331, 1901) Hydroperoxyd auftritt, das bei den beobachteten Reagensglasergebnissen eine Rolle spielen könnte. Denn die Ähnlichkeit der photokatalytischen Effekte mit den Wirkungen des Wasserstoffsuperoxyds ist eine weitgehende, worauf wir wiederholt (z. B. diese Zeitschr. 13, 313, 1908) die Aufmerksamkeit gelenkt haben.

[6]) Versuche sind im Gange, die Farbstoffe der Hämin- und Chlorophyllgruppe sowie verschiedenartige Chinonderivate nach dieser Richtung zu prüfen.

[7]) Man kann auch an eine Rolle wirklicher Farbstoffperoxyde denken, deren Bildung im Licht durch die wichtigen Untersuchungen von Kurt Gebhard (Zeitschr. f. angew. Chem. 23, 820, 1910) erwiesen ist. In Gegenwart oxydierbarer Substrate könnten diese wenigstens teilweise den Farbstoff regenerieren usw. Bekanntlich hat schon W. Straub (Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 51, 383, 1904; Münch. med. Wochenschr. 1904, Nr. 25) auf die Bedeutung der Peroxydbildung, wenn auch in etwas anderen Sinne, hingewiesen. Es scheint nicht angängig, die Sensibilisierung der Ederschen Reaktion durch fluorescierende Farbstoffe gegen die Rolle des Sauerstoffs allgemein geltend zu machen, wie es v. Tappeiner tut (Ergebn. d. Physiol. 8, 717, 1909). Denn die eigentliche

Über das eigentliche Wesen der Fluorescenz sind wir völlig im unklaren. Da sich die Fluorescenzerregung genau wie der Eintritt lichtchemischer Reaktion an die Absorption auffallender Strahlen knüpft, ist es nicht verwunderlich, daß öfter Fluorescenz und photochemische Vorgänge nebenher verlaufen, ohne daß beide voneinander abhängig zu sein brauchen.

Es kommt hauptsächlich darauf an, ob der Zutritt des Lichtes zu dem System dessen Energieinhalt derartig verändert, daß zwischen Katalysator (Mineralsalz, Farbstoff) und Substrat eine Reaktion stattfinden kann, bei der das Substrat oxydiert und der Katalysator reduziert wird (Oxydulstufe). Verwandelt dann der Sauerstoff der Luft den reduzierten Katalysator wieder in eine höher oxydierte Form (Oxydstufe), die vom Substrat bei Bestrahlung reduziert wird, so hat man eine typische Übertragungskatalyse, deren treibende Kraft im Licht gelegen ist.

Das Rätsel aber, warum bestimmte Farbstoffe kräftig, andere äußerst schwach oder gar nicht Lichtenergie übertragen, ist nicht größer als das der Frage, weshalb Eisen- und Uransalze äußerst starke, Mangansalze mäßige und Quecksilber- oder Kupferverbindungen schlechte Lichtkatalysatoren darstellen.

Die komplexen Kupfer-Weinsäureverbindungen, wie sie z. B. in der Fehlingschen Mischung vorliegen, sind immerhin merklich lichtempfindlich, sehr viele andere organische Kupfersalze dagegen nicht. Man kann sich vorstellen, daß ähnliche Unterschiede zwischen der photodynamischen Einwirkung auf komplexe biologische Gebilde[1]) und dem photokatalytischen Effekt auf rein chemische Substrate obwalten.

Reaktion ist eine stöchiometrische; sie ist an sich überhaupt nicht photosensibel und bedarf gerade Ferriionen für ihr Zustandekommen. (Winther, Zeitschr. f. wissenschaftl. Photogr. 7, 409, 1909; 8, 197, 1910). Vielleicht leiten diese den Zerfall der Oxalsäure ein, ähnlich wie bei den zweibasischen Säuren ganz allgemein.

[1]) Gerade die Chinonstruktur der meisten Farbstoffe läßt noch an eine andere Möglichkeit denken. In einer interessanten Studie hat W. Suida (Zeitschr. f. physiol. Chem. 85, 308, 1913) gezeigt, daß sich die verschiedenen Aminosäureverbände mit chinoiden Stoffen in ungleichem Grade anfärben und verknüpfen. Man kann sich unschwer vorstellen, daß die komplexen biologischen Substrate Verankerungsmöglichkeiten bieten, die dem chemischen Individuum in vitro fehlen. Dabei

Neue Versuche sollen lehren, ob die hier dargelegte Auffassung vom Wesen der einschlägigen photokatalytischen Prozesse einen weiteren experimentellen Ausbau des Gebietes ermöglicht.

---

muß man besonders an eine Unterstützung des ganzen Vorgangs durch die bekannten reduzierenden und oxydierenden Faktoren der lebenden Zellen denken, die sich ja einerseits Farbstoffen, andererseits Oxyphenolen gegenüber besonders geltend machen (P. Ehrlich). Wenn diese biologischen Farbstoffbindungen eine noch so geringe Lichtempfindlichkeit besitzen, wird verständlich, warum so viele Farbstoffe photodynamisch wirken, ohne im rein chemischen Versuch nachweisbar Lichtenergie zu übertragen. Die Neigung der Chinone, bei gemeinsamer Belichtung mit anderen Substanzen Hydrochinonderivate zu bilden, kann man den bekannten Versuchen von H. Klinger sowie von Ciamician und Silber entnehmen. Übrigens können im biologischen Experiment — ähnlich wie es sich für die Dichloranthracensulfosäure in vitro ergibt — wirksame Katalysatoren aus dem Ausgangsmaterial auch sekundär hervorgehen.

Erwiderung auf L. Sabbatanis Arbeiten „Über die Wirkung des kolloiden Schwefels usw." und „Wirkung der auf chemischem Wege bereiteten Kohle".[1])

Von

G. Izar.

(Eingegangen am 10. März 1914.)

I.

Vor über einem Jahre habe ich nachgewiesen[2]), daß die intravenöse Einspritzung von käuflichem kolloidem Schwefel (Heyden sowie Kahlbaum) und von auf elektrischem Wege nach Müller und Lukas bereitetem kolloidem Schwefel bei Ratten den von mir benutzten Stamm eines übertragbaren Sarkoms zum Schwunde bringt, während er im übrigen keine Giftwirkung hervorruft.

Daraufhin publizierte Sabbatani[3]) in der Zeitschrift „Pathologica" einen Artikel, in dem er die Resultate eines früheren von ihm stammenden Aufsatzes (in dem er die Giftigkeit eines von Raffo hergestellten Schwefelkolloids nachwies) auffrischte und eine Reihe der neuerdings in dieser Zeitschrift vorgebachten Argumente gegen die Kolloidnatur des Sulfidals anführte.

Demgegenüber erwiderte ich bei jener Gelegenheit, daß ich die ältere Arbeit Sabbatanis über die Giftigkeit des von Raffo bereiteten kolloiden Schwefels genau kannte, daß aber auch eine nach jener Sabbatanis von Nevinny[4]) (damals von Sabbatani nicht berücksichtigten, in dem jetzigen Aufsatze aber besprochenen) im Jahre 1910 publizierte Arbeit zu meiner Kenntnis gelangte, die bezüglich des Sulfidals zu Sabbatani entgegengesetzten Schlußfolgerungen gelangt war und die Sabbatani bis zu jenem Zeitpunkte nicht widerlegt hatte.

Ich bemerkte weiter, daß ich bei diesem Sachverhalte, zumal die sehr verschiedene Toxizität auch nach derselben Methode bereiteter Kolloide hinreichend bekannt ist, es absichtlich vermieden hatte, auf die Frage näher einzugehen, weil dieselbe nur von untergeordneter Bedeutung in bezug auf den Gegenstand meiner Untersuchungen war, indem letztere hauptsächlich die Wirkung des Schwefels auf das Rattensarkom im Auge hatten und derselbe Effekt ja auch durch das auf elektrischem Wege hergestellte Schwefelkolloid erzielt wurde.

---

[1]) Diese Zeitschr. **59**.

[2]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **15**.

[3]) Pathologica **1913**, Nr. 100.

[4]) Ebenda **1913**, Nr. 102.

In dem neuen in dieser Zeitschrift veröffentlichten Aufsatze bringt Sabbatani nun auch die Besprechung der vor über drei Jahren erschienenen Arbeit Nevinnys, auf die ich mich seinerzeit berufen hatte.

Nachdem Sabbatani meine tatsächlichen Angaben bezüglich der Ungiftigkeit des Sulfidals nicht bestreitet und heute sogar nicht mehr seine Kolloidnatur vollständig zu negieren wagt (schreibt er doch, daß das von mir benutzte Sulfidal sich unschädlich zeigte, „weil es gar nicht kolloid war oder wenigstens keinen genügend hohen Dispersitätsgrad besaß“ [im Original nicht gesperrt gedruckt]), liegt für mich keine Veranlassung vor, auf seine heutige Zurückweisung der Arbeit Nevinnys einzugehen, ehe Nevinny selbst zu derselben Stellung genommen: Erstens weil aus den schon im vorigen Jahre Sabbatani entgegengehaltenen, oben wiederholten Gründen der Zusammenhang der Sabbatani-Nevinnyschen Differenz mit meinem Aufsatze nur ein loser und nebensächlicher ist, zweitens weil gerade der Umstand, daß Sabbatani sich zu einer drei Jahre verspäteten Zurückweisung gegenüber Nevinny genötigt sah, den Beweis darstellt, daß ich mich in vollem Rechte befand, auf den Widerspruch zwischen Sabbatani und Nevinny nicht einzugehen.

II.

Ich habe mich bemüht, bei der vorjährigen Ablehnung[1]) eines Vorwurfes Sabbatanis[2]) in der oben besprochenen Angelegenheit des kolloiden Schwefels, S. gegenüber die größtmögliche Rücksicht walten zu lassen. Der seltsam gereizte, bittere Ton, den Sabbatani heute anschlägt, zwingt mich zu meinem Bedauern, diesmal die absolute Nichtigkeit sowohl seiner Kritik als seiner eigenen Befunde unumwunden zu beleuchten.

Patané und ich haben kürzlich nachgewiesen[3]), daß „die venöse Einspritzung großer Mengen von Mellogen (kolloider Kohlenstoff) bei Kaninchen, weißen Ratten, Tauben, Sperlingen starke Dyspnoe hervorruft: nur ein Bruchteil der Tiere erliegt der Einspritzung unter bulbären Erscheinungen“.

Sabbatani fühlt sich berechtigt, diesen Satz in ungetreuer, wesentlich veränderter Form anzuführen, indem er sagt, man lese in unserer Arbeit, daß „die intravenöse Einspritzung großer Mengen von Mellogen (kolloidem Kohlenstoff) giftig und tödlich wirkt“[4]).

S. will nun den Beweis führen, daß die von uns nachgewiesene (jedoch unkonstante) Giftigkeit des Mellogens nicht zu Recht besteht und von seiner Unreinheit herrührt und speziell vom (nach Vanzettis Annahme) festgebundenen CO und von dem Na_2CO_3, das sich aus der zum Zwecke der Lösung zugesetzten Natronlauge in Anwesenheit von CO_2

---

[1]) Pathologica 1918, Nr. 102.

[2]) Ebenda 1918, Nr. 100.

[3]) Diese Zeitschr. 56, Heft 4, S. 307.

[4]) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

bildet. Was das CO anbelangt, das nach Vanzetti[1]) im Verhältnis von 11,33 °/₀ enthalten ist, berechnet S., daß die eingeführte Menge vollauf genügend ist, um den Tod der Versuchstiere hervorzurufen.

Nun haben wir in unserer Arbeit betont, den Umstand ganz besonders hervorgehoben und als paradox bezeichnet, daß die tödliche Wirkung des Mellogens unkonstant ist, indem einige Tiere schon an kleinen Mengen eingehen, während andere beträchtliche (bis 6 fache) Mengen desselben vertragen. Dieses Verhalten ist in keiner Weise, auch nicht durch die Sabbatanische Annahme (daß die Giftigkeit auf Unreinheit des Mellogens beruht) erklärlich. Die ausgesprochene Inkonstanz der Giftigkeit des Mellogens genügt also an sich darzulegen, daß die von uns beobachtete Toxizität jedenfalls nicht auf seiner „Unreinheit" beruht. Schon diese Erwägung allein hätte Sabbatani zur Vorsicht mahnen und zu einer gründlicheren Untersuchung der Angelegenheit führen sollen, die ihm manches erspart hätte.

Der Sachverhalt ist in Wirklichkeit ein gänzlich verschiedener. Die Löslichkeit des Mellogens ist eine ziemlich beschränkte; 5 °/₀₀ ige Lösungen, auf denen die Berechnungen Sabbatanis fußen (von einem in der Korrektur von mir ausgebesserten, aber vom Setzer nicht berücksichtigten Fehler beruhend, den ich nicht eher als jetzt richtigstellen konnte, weil mir die diesbezüglichen Separatabdrücke erst wenige Tage vor dem Erscheinen des Sabbatanischen Angriffes zugegangen sind), sind unmöglich. Wir haben zu unseren Versuchen zwei Mellogenlösungen herangezogen: eine (C I) 1 °/₀₀ und eine (C II) 0,5 °/₀₀, nicht 0,5 °/₀. Auch für die größte, in drei der in den Protokollen wiedergegebenen Versuche (bei denen ein einziges Tier einging) eingespritzte Menge der stärkeren Lösung (C I) bleibt der CO-Gehalt (2,266 mg) weit hinter der von Dreser in 11,5 mg pro Kilogramm Körpergewicht angegebenen tödlichen Minimaldosis CO, auf die sich Sabbatani bezieht, zurück und beträgt kaum $^1/_4$ derselben.

Einen zweiten noch schwereren Vorwurf erhebt Sabbatani uns gegenüber. Von der **gänzlich willkürlichen** Annahme ausgehend, daß zur Herstellung der Mellogenpseudolösungen „nur" 2 °/₀ Natronlauge verwendet worden sei, berechnet er, daß bei Einspritzung von 20 ccm Mellogenpseudolösung 0,66 g kohlensauren Natrons eingeführt, also eine über dem Durchschnitt der tödlichen (0,60 g pro Kilogramm) liegende Dosis. Dieses „nur" ist bemerkenswert. Demgegenüber genügt es, darauf hinzuweisen, daß wir in unserer Arbeit angegeben hatten, daß das Mellogen „leicht in Anwesenheit kleiner Alkalimengen löslich ist". Schwerlich dürfte sich ein Forscher eines Lächelns erwehren, wenn zu Polemikzwecken diese Angabe zu einer 2 °/₀ igen Sodalösung gestempelt wird. Und dabei hatte doch auch Vanzetti[1]) hervorgehoben, daß „die Tatsache interessant ist, daß während das Kolloid (Mellogen) leicht in **stark verdünnten** alkalischen Lösungen in Suspension übergeht, dasselbe wieder ausfällt, wenn der Alkalinitätsgrad eine gewisse Grenze übersteigt". In Wirklichkeit betrug die zur Herstellung der Mellogenpseudolösungen zugesetzte Menge von

---

[1]) Atti del Reale Istituto Veneto di scienze, lettere ed arti. 72.

Natronlauge, anstatt der hyperbolischen 2%, 0,008%, **also nichts weniger als 250mal weniger als sich Sabbatani unstatthaft vorstellt.**

Und nun gar der den Gelatinezusatz betreffende Einwand! Sabbatani glaubt, daß man bei Zusatz von 1‰ Gelatine (soviel betrug der Zusatz in meinen Versuchen) „von solchen Lösungen alles erwarten darf, wenn sie intravenös eingespritzt werden". Daß aber der Zusatz nicht „unnötig" war und nicht „nur den biologischen Versuch sowie seine Deutung kompliziert", wie Sabbatani meint, sondern daß dieser Zusatz in Parallelversuchen zur Kontrolle streng nötig war, darüber wird sich Sabbatani eines besseren überzeugen, wenn er erfahren haben wird, daß, und zwar gerade bei biologischen Versuchen, die Wirkung gewisser Kolloide (koll. Silber, Gold usw.) erst nach Zusatz eines Stabilisators, wie die Gelatine, zutage tritt.

Wenn wir nun die Unterschiede der Resultate zwischen unseren und Sabbatanis Untersuchungen ins Auge fassen (unkonstante Giftigkeit des Vanzettischen Kolloides, konstante Ungiftigkeit des Sabbatanischen), so könnten dieselben zwanglos mit Verschiedenheiten der beiden Kolloide erklärt werden und sie würden nur ein neues Beispiel der zur Genüge bekannten Tatsache darstellen, daß verschiedene, sogar auf demselben Wege hergestellte Kolloide ein und desselben Elementes sehr verschieden wirksam und giftig sein können (Henri, Foà). Diese Erklärung würde aber erst dann zulässig sein, wenn Sabbatani einwandfrei den Beweis für die Ungiftigkeit seines kolloiden Kohlenstoffs erbracht hätte. **Nun sind aber alle die Versuche, auf denen Sabbatani die Behauptung der Unschädlichkeit seines Kohlenstoffkolloides stützt, fehlerhaft.** Denn sämtlichen diesbezüglichen Experimenten intravenöser Einführung des Kolloids haftet der Grundfehler an, daß 1% Kochsalz hinzugefügt wurde.

Es besteht nämlich die bekannte Möglichkeit, daß der Elektrolytzusatz das Kolloid (sei es auch nur teilweise und in sich makroskopisch nicht sofort kundgebender Weise) ausgeflockt und folglich unwirksam gemacht habe. Nachdem Sabbatani den Beweis, daß diese naheliegende Möglichkeit nicht zutrifft, schuldig geblieben ist, also solche Bedingungen gewählt hat, die geeignet sind, die eventuelle Giftigkeit des von ihm geprüften Präparates zu unterdrücken, sind alle seine diesbezüglichen Versuche als nichtig zu bezeichnen.

So fällt einerseits das kritische Sabbatanische Gebäude in sich selbst zusammen, da es sich auf willkürliche, unzutreffende und unzulässige Annahmen (Zusatz von 2% NaOH) auf diese weiter konstruierte und folglich falsche Berechnungen (Tod durch Na_2CO_3) und ungetreue Wiedergabe unserer Befunde stützt; andererseits geht seinen eigenen diesbezüglichen Versuchen auch die geringste Beweiskraft ab.

Erwiderung an L. Sabbatani.

Von

A. Fagiuoli.

(Eingegangen am 10. März 1914.)

Bezüglich der von mir in dieser Zeitschrift veröffentlichten Untersuchungen über die Wirkung des kolloiden Schwefels auf die Autolyse[1]) bemerkt Sabbatani in seiner Arbeit „Über die Wirkung des kolloiden Schwefels usw.[2])", daß ich erstens den Schwefel Heydens und Kahlbaums verwende im Glauben, kolloiden Schwefel vor mir zu haben; zweitens, daß ich nicht bemerke, daß beim Mischen von Schwefel mit Leberbrei sich Schwefelwasserstoff entwickelt. Deshalb seien meine Folgerungen doppelt irrig.

Was den ersten Punkt anbelangt, begnüge ich mich, mich auf die vorausgehenden Ausführungen Izars zu berufen. In bezug auf den zweiten bemerke ich, daß in der Angelegenheit allerdings etwas vollständig irrig ist: Das Irrige liegt aber auf Sabbatanis Seite.

Ich habe mich nämlich auf die Feststellung beschränkt, daß die Leber- und Tumorautolyse durch Zusatz von kolloidem Schwefel Heyden und Kahlbaum beschleunigt wird; habe mich aber über den Mechanismus dieser Beschleunigung nicht geäußert. Es mag wohl sein, daß dieselbe zum Teil durch Entwicklung von H_2S zustande kommt: das Zutreffen dieser Möglichkeit wäre durch besondere Versuche zu prüfen, ohne die ich mich nicht berechtigt fühlte, sie auszusprechen. Gegebenenfalls würde sie in den Rahmen der von M. Ascoli[3]) ausführlich entwickelten Auffassung der biologischen Wirkung von anorganischen Kolloiden unterzubringen sein, „daß es sich auch bei der Verwendung von (anorganischen) Hydrosolen in letzter Instanz um Ionenwirkung handelt", die von den Hydrosolen in der organischen Flüssigkeit in Freiheit gesetzt werden. Nur hat Sabbatani ganz übersehen, daß, falls dies der Wirkungsmechanismus der von mir benutzten Kolloide tatsächlich sein sollte, genau derselbe auch der jedes anderen Schwefelkolloids sein müßte, wenn, gerade seinen Ausführungen zufolge, „der Schwefel nur wirksam wird, insoweit er sich in Schwefelwasserstoff umwandelt" und bei „höherem Dispersitätsgrade die Bildung von Schwefelwasserstoff um so schneller erfolgen" muß.

---

[1]) Diese Zeitschr. **56**.

[2]) Diese Zeitschr. **59**.

[3]) Zeitschr. f. Industrie u. Chem. der Kolloide **1909**.

Die physiologische und therapeutische Wirkung von Pankreasextrakten.

Von

Franz Müller und S. N. Pinkus.

(Aus dem Tierphysiologischen Institut der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 26. Februar 1914.)

Mit 8 Figuren im Text.

Einleitung.

Nachdem die alte Organtherapie schon abgetan erschien, sind in den letzten Jahren bei der chemischen und pharmakologischen Durchforschung der Drüsenextrakte die bedeutungsvollsten Entdeckungen gemacht worden. Wir erinnern nur an die Synthese des Adrenalins, die Auffindung des Sekretins, an die Feststellung der eigenartigen Wirkung der Hypophysenextrakte. So hat die Organtherapie einen neuen, in seinem schließlichen Resultat noch nicht übersehbaren, ungeahnten Aufschwung genommen. Unsere Auffassung über die im Organismus tätigen Korrelationen hat unter dem Einfluß der Starlingschen Ideen über die Wirkung der Hormone, der Entdeckung der Anaphylaxie und der Abderhaldenschen Organfermente eine ganz neue Gestalt angenommen, und dieser Entwicklung hat sich auch die Methodik der pharmako-dynamischen Untersuchung der Organextrakte anpassen müssen. Wir wissen, daß für die Funktion eines Organes außer den im Organ selbst erzeugten wirksamen Stoffen die aus anderen Organen eingewanderten in Betracht kommen, und müssen daher bei der Untersuchung der physiologisch aktiven Bestandteile gewisser Organe auch mit dem Vorhandensein aus anderen Drüsen stammender aktiver Stoffe rechnen. Außerdem aber sind gewisse in den Organen selbst gebildete Stoffe in der

Drüse oft in inaktivem Zustande enthalten, wie z. B. die Profermente. Andere können bei nicht genügender oder übermäßiger Inanspruchnahme des Organs für die Zwecke des Gesamtorganismus aus der Drüse zeitweilig verschwinden.

Im Vergleich mit der Untersuchung von Pflanzendrogen ergibt sich vollends die Schwierigkeit, daß die aktiven Stoffe animalischen Ursprungs dem tierischen Organismus chemisch näher stehen, und ihre Wirkungen daher nicht so scharf ausgesprochen sind. Mit der Zeit wird sich hieraus eine Vertiefung unserer Kenntnisse der Giftwirkungen überhaupt ergeben, vorläufig kompliziert es die Untersuchung, da nur wenige Extrakte scharf definierte primäre Wirkungen auslösen. Oft wird durch eine Substanz erst die Ausscheidung einer anderen bewirkt (Hormone), oder eine andere aus einer inaktiven in eine aktive Form verwandelt (Kinasen). Es können hierbei beide Substanzen, oder nur eine von ihnen Allgemeinwirkungen auslösen. Ist nur die sekundär entstehende Substanz aktiv, so kann z. B. nach wiederholter Injektion der ihre Ausscheidung bedingenden Substanz eine Erschöpfung der sezernierenden Drüse eintreten, und die Reaktion versagt. War die Drüse von vornherein erschöpft, so scheint die Substanz selbst inaktiv zu sein. Sind beide Substanzen aktiv, so wird sich ihre Wirkung algebraisch summieren. Ist dann eine von ihnen kurzlebiger als die andere, und sind ihre Wirkungen entgegengesetzt, so kann die Reaktion plötzlich umschlagen. So bewirken Injektionen von Organextrakten meist Blutdruckerniedrigung. Manche wirken gleichzeitig auf die Sekretion der Nebenniere. Das so in Freiheit gesetzte Adrenalin kann unter Umständen in solchen Mengen auftreten, daß es, der ursprünglichen Wirkung entgegen, den Blutdruck in die Höhe treibt. Da das Adrenalin jedoch schnell oxydiert wird, so kann, falls die ursprüngliche Substanz noch zirkuliert, ihre Wirkung auf die Nebenniere aber schon erschöpft ist, diese Blutdrucksteigerung in eine Senkung umschlagen. Geradezu verhängnisvoll war der Umstand, daß die moderne systematische Untersuchung hier erst einsetzte, nachdem die experimentelle Toxikologie und Pharmakologie der Mineral- und Pflanzenstoffe sich schon methodologisch gefestigt hatten. Es wäre interessant, nachzuweisen, wie durch voreilige Analogieschlüsse wertvolle Forschungsergebnisse ver-

sandeten, wie Wesentliches verdeckt, Zufälliges in den Vordergrund getrieben wurde. Hier sei nur darauf hingewiesen, wie lange z. B. die Fermente konsequent den Toxinen angereiht wurden, und zwar nicht nur wegen ihrer vermeintlichen toxischen Wirkungen, die in Wahrheit den beigemengten Fäulnisprodukten anhängen, sondern weil durch die gleichzeitig beobachtete Bildung von Antifermenten und Antitoxinen eine durchgreifende Gleichheit der übrigen Eigenschaften suggeriert wurde.

Schließlich leidet die Bewertung des einschlägigen experimentellen Materials darunter, daß man die „Materialienkunde“ außer acht gelassen hat. Besonders schlimm liegt es auf dem Gebiete der Fermentpräparate, bei denen eine Sterilisierung des Rohmaterials durch Abkochen von vornherein unmöglich war. Hier haben die bakteriellen Verunreinigungen der Präparate allerdings eine weitgehende Ausarbeitung der chemisch-physikalischen Probleme nicht gestört. Doch würde kein Kliniker oder Pharmakologe daran denken, mit Pflanzendrogen von einer solchen Unzuverlässigkeit zu arbeiten, wie es gerade diese Präparate meist sind. Da kann es nicht wundernehmen, daß die Mischung von Fäulnisprodukten und Salzen, die unter dem Namen „Pepsin“ und „Trypsin“ oder „Pankreatin“ in den Handel kommen und ohne nähere Prüfung bona fide angewandt werden, die mühevollsten Untersuchungen entwerten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher vor allem mit der Drogenkunde der Pankreasextrakte. Hier ist es gelungen die physiologischen Wirkungen festzustellen, die zufälligen und vermeidbaren Verunreinigungen zuzuschreiben sind. Dann galt es, die Forderungen zu präzisieren, die man an die für physiologische und klinische Zwecke zu benutzenden Präparate zu stellen hat. Die Ausarbeitung einer einfachen, bequemen Methode zur Auswertung der Proteolyse eröffnete die Möglichkeit, prinzipielle Unterschiede in den physiologischen Wirkungen tryptisch hoch aktiver und verdünnter Lösungen klarzulegen, daß nämlich die akute Giftigkeit hochaktiver Extrakte wesentlich auf Ätzwirkungen zurückzuführen ist, während Verdünnungen, wie sie für therapeutische Verwendung in Betracht kommen, ungiftig sind. Hiermit dürfte der lange Kampf endgültig zugunsten des Vorkämpfers für die Ungiftigkeit der

Fermente, Fermi's, entschieden, und der letzte Grund zur Anreihung der Fermente an die Toxine gefallen sein.

Wir überlassen die Frage der Reindarstellung der einzelnen aktiven Bestandteile des Pankreasextrakts, speziell des Trypsins, einer späteren Untersuchung; vorläufig scheint sie trotz trefflicher Arbeiten von Michaelis u. a. der Lösung nicht wesentlich näher gerückt. Es trat zwar im Verlaufe unserer bisherigen Arbeiten eine weitgehende Unabhängigkeit der physiologischen von der tryptischen Wirkung zutage. Damit ist jedoch noch längst nicht bewiesen, daß die Gruppe, die die physiologischen Wirkungen auslöst, nicht irgendwie mit der „enzymophoren" zusammenhängt. In Berücksichtigung dieser und anderer Umstände benutzen wir im folgenden statt des Wortes „Fermentkonzentration" den weniger präjudizierenden Ausdruck „Wirkungsgrad".

Die Arbeit schließt mit einer Analyse der physiologischen Wirkungen einwandfreier Pankreasextrakte, deren Ergebnis durch die vorhandenen klinischen Beobachtungen ergänzt wird. Nur so ergibt sich eine klare Fragestellung, eine reinliche Trennung der verschiedenen Forschungsrichtungen.

Die Verunreinigungen der Pankreaspräparate.

Behandelt man den Pankreasextrakt als Droge schlechthin, so muß man sich zunächst über die Haltbarkeit des Ausgangsmaterials und die bei der ev. Zersetzung entstehenden Stoffe Klarheit verschaffen. Die Pankreasdrüsensubstanz ist außerordentlich leicht zersetzlich. Es verfällt unter allen Drüsen nur noch die Leber ähnlich schnell der Fäulnis, doch entstehen im Pankreas bei weitem giftigere Produkte. Selbst nach aseptischer Entnahme und Aufarbeitung der Drüsen oder ihrer aseptischen Extrakte bilden sich, infolge der schon nach $^1/_2$ bis 2 Stunden einsetzenden Autolyse, physiologisch stark wirkende Stoffe. Die Autolyse setzt das Trypsin außerdem in Freiheit und dies leitet nun seinerseits eine Selbstverdauung ein (Vernon[1]). Die gebildeten Stoffe haben zum Teil den Cha-

[1]) L. Lattes (Virchows Archiv 211, 1) ist es gelungen die diese Aktivierung des Trypsins bewirkende Substanz im Pankreasautolysat näher zu charakterisieren.

rakter der von Schittenhelm[1]) beschriebenen Kyrine. Sie werden dem trockenen Material durch Aceton oder Methylalkohol zum Teil entzogen, haften ihm aber so hartnäckig an, daß man sie weder durch erschöpfende Extraktion noch durch Dialyse vollkommen entfernen kann. Sie lassen sich selbst aus den Auszügen weder durch Dialyse noch durch sorgfältigste Fraktionierung entfernen.

Die Wirkung dieser Produkte der Fäulnis und Autolyse äußert sich beim Tier schon nach der Injektion weniger Kubikzentimeter des Extraktes, sowohl lokal in Gestalt von starkem Ödem, dem tiefgreifende Induration und Nekrose folgt, wie allgemein durch Temperaturanstieg um 1 bis 2° und Schlaffheit, Appetitlosigkeit, Abmagerung. Beim gesunden Menschen verursacht ein solcher Extrakt beträchtliche lokale Entzündung, Temperatursteigerung mit Schüttelfrost, Übelkeit oder Erbrechen, Rückenschmerzen, Schwindel, Ohnmacht. Einnahme kleinerer Mengen per os ruft dagegen keine bemerkenswerten Erscheinungen hervor.

Die folgenden einer früheren Arbeit von S. N. Pinkus und Pinkuss entnommenen Versuche beweisen dies für das Tier.

I. Es wurden mit Injectio Trypsini Fairchild (2200 V.-I.[2]) subcutan injiziert: Hund 1 (4,6 kg) mit 5 ccm, 2 Meerschweinchen (220 und 280 g) mit je 1 ccm, 1 Katze (3,4 kg) mit 3 ccm, 1 Kaninchen (1,3 kg) mit 3 ccm. Bei keinem der Tiere kam es zu irgendwelchen abnormen Erscheinungen, nicht einmal zu andauernder Temperaturerhöhung. Selbst das Kaninchen zeigte keine lokale Reaktion. Darauf wurden Dauerversuche an 3 Hunden und 3 Meerschweinchen angestellt. Hund 2 (11 kg) erhielt in 38 Tagen 16, Hund 3 (6,5 kg) 20 Injektionen zu 1 ccm Injectio Trypsini Fairchild in unregelmäßigen Abständen. (Hund 3 erhielt im Beginn 6 ccm.) Hunde 4 und 5 (8,5 und 7,5 kg) erhielten 4 Wochen lang je 1 g Holladin (trockenen Pankreasextrakt) täglich per os und je 6 Injektionen von 3 bis 6 ccm Injectio Trypsini. 2 Meerschweinchen (640 und 580 g) erhielten in 24 Tagen je 16 Injektionen zu 0,5 bis 1 ccm. Keines der Tiere zeigte während der ganzen Zeit Temperaturveränderung noch irgendwelche beachtenswerten lokalen Reaktionen. Bei Hund 3 und 5 waren die Organe, speziell Magen und Leber, makroskopisch normal. Pankreas und Darm zeigten auch mikroskopisch keine Verände-

---

[1]) Vgl. auch A. Schittenhelm und H. Ströbel, Über die Giftigkeit arteigener Eiweißabbauprodukte. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 1912, 110: „Es ist klar, daß man . . . ganz frische Organe vor dem Versuch getöteter Tiere nehmen muß . . .“

[2]) V.-I. = Verdauungsindex nach der Auswertungsmethode auf S. 346.

rung. Die Injektionsstellen (an einer Stelle wurde 6 mal hintereinander injiziert) zeigten außer geringfügigen Indurationen nichts Abnormes.

II. Hunde 1, 2 und 4, und 7 Meerschweinchen wurden mit sterilen Lösungen von Pankreaspräparaten anderer diverser Provenienz und zwei selbstbereiteten sterilen Pankreasextrakten aus etwas angefaulten Drüsen injiziert (alle unter 100 V.-I.[1]), die Hunde mit je 1 ccm, die Meerschweinchen mit $^1/_2$ ccm täglich. Hier genügten schon 1 bis 2 Injektionen, um die Temperatur der Tiere andauernd um 1 bis 1,8° in die Höhe zu treiben; in allen Fällen zeigte sich starke lokale Reaktion, die stets zu weitgehenden Nekrosen führte. 5 Meerschweinchen und Hund 4 erlagen nach 8 bis 10 Tagen. In allen Fällen zeigten die Injektionsstellen ausgedehnte Nekrosen und der Darm weitreichende Entzündungen, Erosionen, selbst Blutergüsse. Pankreas unverändert. Bei den übrigen 2 Hunden und 2 Meerschweinchen ging nach Injektion mit je 5 Injektionen Amylopsin zu je 1 g (d. h. einem Pankreasextrakt, vorwiegend Diastase und nur 100 V.-I. Trypsin enthaltend), ob post hoc oder propter hoc ist unbestimmt, die Temperatur und zum großen Teil auch die lokalen Erscheinungen zurück. Einen bemerkenswerten Unterschied zeigte auch das Serum der Hunde in beiden Versuchsreihen. Während die mit Injectio Trypsini Fairchild behandelten Tiere keine Antifermentbildung aufwiesen, zeigte das Serum der Tiere der zweiten Serie mehr oder minder starke antitryptische Eigenschaften.

Während das aktive Trypsin durch Fäulnis, Autolyse oder Selbstverdauung in den Trockenpräparaten oder flüssigen Extrakten frei wird und in ihnen neben Diastase und Lipase vorhanden ist, besitzt der aus der vollkommen frischen Drüse hergestellte Preßsaft keine proteolytischen Eigenschaften, kann aber durch Zusatz von Darmschleimhaut aktiviert werden. Die Injektion weniger Kubikzentimeter eines solchen, durch Kälte oder Zusatz von Glycerin vor Fäulnis und Autolyse geschützten Preßsaftes, gleich ob er tryptisch aktiv oder inaktiv ist, erzeugt lokal höchstens ein geringes, schnell verschwindendes Ödem, aber keine Allgemeinerscheinungen.

Der (nicht proteolytisch wirksame) Pankreasfistelsaft von Hunden variiert, wie schon Pawlow nachgewiesen, in seiner Zusammensetzung sehr erheblich, fast noch mehr, wie wir fanden, in seiner physiologischen Wirkung. Es gelingt nur selten, einen nach Injektion völlig ungiftigen Saft zu gewinnen. Speziell nach Reizung der Drüse, oft aber ohne jede nachweisbare Ursache, kann die Injektion des Fistelsaftes schwer toxisch

---

[1]) V.-I. = Verdauungsindex nach der Auswertungsmethode auf S. 346.

wirken, und zwar wirkt dann der aktivierte weit intensiver, lokal und allgemein, als der nicht aktivierte Saft[1]).

Die Drüsenextrakte werden häufig mit Salzen fraktioniert, um die Proteine möglichst vollständig abzuscheiden. Die Salze werden jedoch nur selten vollkommen entfernt, so daß Trockenpräparate große Mengen davon enthalten. Besonders störend hat sich bei klinischen und physiologischen Untersuchungen die Anwesenheit des Ammonsulfats bemerkbar gemacht. Noch viel schlimmer steht es mit der Sterilität solcher Präparate: manche von ihnen, wenn nicht die meisten, können an Bakterienreichtum mit Kot konkurrieren. Daß die Folgen nicht ausbleiben, beweist der traurige Fall aus der Heidelberger Klinik, bei dem ein Patient nach Injektion von Carbenzym (durch Kohle adsorbiertes Trypsin) an Tetanus verstarb[2]) — kein Wunder, daß solche Ungehörigkeiten den Kliniker immer wieder von einer weiteren Verwendung der Trypsinpräparate am Krankenbett abschrecken.

Man muß also die Forderung stellen, daß Pankreaspräparate, die nach Injektion weniger Kubikzentimeter beim gesunden Tier oder Menschen die beschriebenen Intoxikationserscheinungen hervorbringen und unter einem bestimmten Wirkungsgrad stehen (Näheres s. S. 346 ff.) vom therapeutischen Gebrauch unbedingt auszuschließen sind.

Die Feststellung des Wirkungsgrades von Pankreasextrakten.

Wissen wir zwar, welche Verunreinigungen in einem Pankreasextrakt zu vermeiden sind, so fehlt bisher jede Andeutung, welche Stoffe in den therapeutisch zu verwendenden Extrakten

[1]) Wir müssen auf Grund dieser Beobachtung die Ansicht Kirchheims (Über die Giftwirkung des Trypsins und seine Fähigkeit, lebendes Gewebe zu verdauen. Habilitationsschrift, Leipzig 1911; Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 74, 374, 1913) und Fischlers (F. Fischler und E. C. Cutler, Die Rolle des Pankreas bei der zentralen Läppchennekrose der Leber. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 75, 1, 1913), die die verschiedenen Pankreatitiden ausschließlich auf tryptische Wirkungen zurückführen möchten, als verfrüht bezeichnen, da hier, wie übrigens schon v. Bergmann und Guleke argwöhnten, mit ziemlicher Sicherheit noch andere Reizsubstanzen eine nicht geringe Rolle spielen.

[2]) Ein Tetanusfall nach subcutaner Injektion von Radiolcarbenzym. Münch. med. Wochenschr. 1911, Nr. 17, S. 904.

in der Tat vorhanden sein müssen, und welche Begleitsymptome bei der Heilung einer mit Pankreasextrakt behandelten Krankheit erwünscht und wie sie zu deuten sind.

Der Trockensubstanzgehalt oder der Stickstoffgehalt eines Extraktes sagen uns ebenso wenig, wie etwa bei einer Droge der Cellulosegehalt. Die allein sicher und leicht zu charakterisierende und zu messende Wirkung, die proteolytische, ist ja an minimale Mengen Substanz gebunden. Die Verschiedenheit des Stickstoffgehalts bei gleicher tryptischer Wirkung soll durch einige Zahlen illustriert werden: Die folgenden 7 Präparate (A bis VI) waren alle auf gleiche proteolytische Wirkung (s. S. 346) eingestellt. A war ein selbstbereitetes Präparat von hohem tryptischen Wirkungsgrad, das lange Zeit gegen fließendes destilliertes Wasser unter ständigem Zusatz der nötigen Salzmenge dialysiert und dabei der Selbstverdauung überlassen war, I bis VI waren käufliche Präparate, von denen I, II und V bei chirurgischer Tuberkulose erfolgreich verwendet wurden.

A:	$N \times 6{,}25$ . . .	0,00018 %	Rohprotein
I:	$N \times 6{,}25$ . . .	0,076 %	"
II:	$N \times 6{,}25$ . . .	0,102 %	"
III:	$N \times 6{,}25$ . . .	8,34 %	"
IV:	$N \times 6{,}25$ . . .	11,13 %	"
V:	$N \times 6{,}25$ . . .	10,33 %	"
VI:	$N \times 6{,}25$ . . .	5,38 %	"

Von den im Pankreas vorhandenen Fermenten: Diastase, Lipase und Trypsin, ist das letzte am besten erforscht. Nach den Untersuchungen von Eduard Müller und Jochmann ist es mit den intracellulären und den Leukocytenenzymen zum mindesten nahe verwandt. Eine allgemeine physiologische Wirkung von Lipase und Diastase kennt man nicht. Die Kliniker haben den Eindruck, daß die günstigen Wirkungen des Pankreasextraktes bei Knochentuberkulose mit dem proteolytischen Ferment irgendwie zusammenhängen. Wenn sich auch im folgenden zeigen wird, auf wie schwacher Grundlage diese Ansicht zurzeit noch steht, so müssen wir doch jedenfalls die proteolytische Wirkung als das charakteristischste Merkmal der Pankreasextrakte ansehen. Sicher von ausschlaggebender Bedeutung ist das Trypsin bei einer Verwendungsart, die die

Pankreaspräparate in Amerika, England und Frankreich schon seit Dezennien in größtem Maßstabe gefunden haben. Sie werden dort in Form von Trockenpräparaten zur Herstellung sog. humanisierter Milch für Kinder und Kranke benutzt, die außer Trypsin die nötige Menge Milchzucker und Salze enthält:

Kuhmilch wird z. B. mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt, dann nach Zusatz einer bestimmten Menge des „Humanisierpräparates" in Soxhlet- oder andere Sterilisierflaschen gefüllt, in einem Gefäß mit kaltem Wasser in 1 bis $1^1/_2$ Stunden zum Kochen gebracht und noch ca. $^1/_2$ Stunde weitergekocht. Es genügt dieses kurze Anwärmen, um durch Trypsinverdauung gewisse Mengen Caseosen entstehen zu lassen, die das Caseingerinnsel in die gleiche zarte, feinflockige Form bringen, die es in der Menschenmilch besitzt. Die Milch wird so zugleich sterilisiert, ohne irgendetwas an Verdaulichkeit einzubüßen — sie ist ja durch das Verfahren schon zum Teil „verdaut" worden. Unseres Erachtens sollte man zu einer derartigen Milch noch einen Löffel Malzextrakt mit Lebertran hinzufügen, um leichtverdauliches Fett, Zucker und, last not least, auch die für den Säugling nötige Diastase einzuführen.

Für die Diätetik des Krankenbettes, ganz speziell für die rectale Ernährung, ist die Vorverdauung sowohl von Eiweiß wie von Kohlenhydraten von großer Bedeutung. Da die Untersuchungen Emil Fischers und Abderhaldens das durchaus Rationelle einer Ernährung mit vorverdauten Nährstoffen dargetan, wäre es auch in Deutschland sicherlich an der Zeit, dieser Frage näherzutreten, der die Leubeschen Untersuchungen nur wegen Unzulänglichkeit des Materials keine Lebenskraft zu geben vermochten.

Auch wir haben die tryptische Wirkung zum Ausgangspunkt unserer Prüfung genommen und versucht, eine möglichst einfache und bequeme Technik auszubilden, die bei genügender Genauigkeit einen Vergleich verschiedener Präparate auf ihren proteolytischen Wirkungsgrad hin zuläßt. Die sonst ausgezeichneten Methoden, die die Caseinverdauung benutzen, versagen für die allgemeine klinische Anwendung vollkommen, da die Wirkung, wie schon Marcus[1]) u. a. betont, sich zu schnell und zu sprungweise vollzieht und zu sehr von der Temperatur und der Zeit abhängt. Sehr brauchbar sind die Plattenmethoden, doch sind die von Eduard Müller[2]) vorgeschlagenen Serum-

---

[1]) Marcus, Verbessertes Verfahren zur Bestimmung der antitryptischen Kraft des Blutes. Berl. klin. Wochenschr. **1909**, Nr. 4. — L. Brieger und Trebing, Über die antitryptische Kraft des menschlichen Blutserums. Ebenda **1908**, Nr. 22.

[2]) Eduard Müller und A. Peiser, Über die Technik der Antifermentbehandlung eitriger Prozesse. Beiträge z. klin. Chir. **1908**, 236.

platten nicht leicht herzustellen und erfordern einen auf 55° eingestellten Brutschrank. Am geeignetsten ist die von Fermi angegebene und von Kantorowicz in Plattenform[1]) durchgeführte Bestimmungsart, bei der Verflüssigung der Gelatine durch Trypsin bei Zimmertemperatur als Index benutzt wird. Wir haben diese Gelatineplattenmethode auf folgende Weise vereinfacht:

Es wird gut ausgeweichte Gelatine so sorgfältig neutralisiert, daß sie auf amphoterem Lackmuspapier amphotere Reaktion gibt, unter Zusatz von 50 ccm 10°/$_0$iger alkoholischer Thymollösung, 0,1°/$_0$ Citronensäure und 10°/$_0$ Glycerin mit physiologischer Kochsalzlösung auf 8 bis 10°/$_0$ Gelatine gebracht und in Petriplatten gegossen, die auf der Rückseite mit Blaustift in numerierte Felder geteilt sind. Die Platten sind vor Laboratoriumsdämpfen (Säuren, Formalin usw.) geschützt aufzubewahren. Der zu untersuchende Extrakt wird zunächst 10fach mit 40°/$_0$igem Glycerin verdünnt und danach folgende Verdünnungen wiederum mit 40°/$_0$igem Glycerin hergestellt: 1 : 300, 400, 500, 600, 800, 1000 usw. Aus jeder dieser Lösungen wird eine Platinöse von der in der Bakteriologie üblichen konstanten Größe jeweils auf ein Feld aufgetragen und die Platte bei Zimmertemperatur ca. 20 Stunden lang stehen gelassen. Man sieht dann auf der Platte nach Abspülen mit 4°/$_0$igem Formalin, das die Fermentwirkung aufhebt, eine Reihe fortschreitend abnehmender Vertiefungen, bis schließlich ein Feld keine Delle mehr zeigt. Man kann dann zwischen den letzten beiden Konzentrationen je nach der gewünschten Genauigkeit weiter interpolieren. Als Verdauungsindex (im folgenden V.-I. abgekürzt) bezeichnen wir diejenige Verdünnung, die gerade noch eine ganz schwache Vertiefung hervorgebracht hat.

Schon nach den ersten Versuchen unterscheidet man ohne Schwierigkeit zwischen den genau abgegrenzten, wie ausgestanzten Dellen, die durch Trypsin, und denen, die durch Einwirkung des Erepsins entstehen. Diese sind flach, mit ungleichmäßigen Rändern, sehen etwa wie flache ulcerierende Geschwüre aus. Das Erepsin ist in allen Pankreatinpräparaten enthalten, die durch Zusatz von Darmschleimhaut aktiviert worden sind. Meistens handelt es sich allerdings um ganz unbedeutende

[1]) Kantorowicz, Münch. med. Wochenschr. 1913, 2496.

Mengen, deren Wirkung in hochwertigen Präparaten — und es lohnt sich nie, mit solchen unter 1000 V.-I., d. h. solchen, die nicht noch bei 1000facher Verdünnung eine Delle geben, zu arbeiten — gegen die das an und für sich kräftigere Trypsin wenig in Frage kommt. Die Erepsinwirkung stört etwas mehr bei der genaueren Einstellung von Pankreasextrakten, jedoch nur, wenn man die Platten länger als 24 Stunden und bei Temperaturen über 20° stehen läßt.

Es ist sehr erfreulich, daß die Auswertung nach dieser Gelatineplattenmethode gut übereinstimmt mit den Angaben der Serumplatten und denen der Fuld-Großschen Methode, wenn man im letzten Fall die Caseinlösung mit der zu prüfenden Fermentlösung etwa 1 bis $1^1/_2$ Stunden im Brutschrank stehen läßt. Während die Caseinmethode aber die geringste Konzentration anzeigt, die eine gewisse Menge Casein gerade zu verdauen vermag, gibt die Gelatineplatte diejenige Konzentration an, bei der die verdauende Wirkung auf Proteine eben beginnt. Sie ist also von der Proteinmenge unabhängig.

Auch die bei Antitrypsinbestimmungen im Blut und Harn erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den nach den üblichen Methoden gewonnenen überein.

Wir möchten daher vorschlagen, die so überaus einfache, ohne Brutschrank arbeitende Gelatineplattenmethode bei weiteren Fermentuntersuchungen wenigstens vergleichsweise zugrunde zu legen und die leicht zu bestimmende Konzentration einer Trypsinlösung, die gerade noch deutlich eine Gelatineplatte anzugreifen vermag, als Verdauungsindex (V.-I.) anzunehmen, etwa in dem Sinne, in dem man die Ehrlichschen Einheiten für Toxine und Antitoxine akzeptiert hat.

Für die Bestimmung der Diastase des Extraktes ist die von Wohlgemuth[1]) angegebene Methode vollkommen ausreichend. Die gegen sie erhobenen Einsprüche verraten einen Mangel an Übung oder Erfahrung in Arbeiten mit Fermenten. Sie versagt selbst nicht in Gegenwart größerer Eiweißmengen[2]).

---

[1]) J. Wohlgemuth, Pankreas, Leber und Kohlenhydratstoffwechsel. Berl. klin. Wochenschr. 1918, Nr. 8.

[2]) Bekannlich beruht sie auf der Feststellung derjenigen Konzentration von Diastase, die eine Stärkelösung vollkommen in die mit Jod keine Blaufärbung gebenden Abbauprodukte verwandelt.

Man kocht in solchem Falle nach genügend langem Verweilen der Röhrchen im Brutschrank die Flüssigkeit auf, filtriert vom koagulierten Eiweiß durch ein Filter aus recht weichem Filtrierpapier und macht jetzt ungehindert die Jodprobe.

Der von uns verwendete Pankreasextrakt.

Da uns besonders daran liegen mußte, alle Untersuchungen mit einem möglichst einheitlichen, haltbaren Material durchzuführen, und die Herstellung eines solchen im Kleinen ein ziemlich aussichtsloses Unternehmen ist, zogen wir es vor, uns eines Präparates zu bedienen, das außer diesen Eigenschaften schon eine klinische Geschichte hat. (Der tryptische Wirkungsgrad der verwendeten Lösungen wurde selbstverständlich jedes Mal festgestellt.) Die Injectio Trypsini der Firma Fairchild Bros. & Foster wurde schon 1902 von Lewis[1]) zur Behandlung der Lungentuberkulose empfohlen, und wird seit 1905 nach Anregung von J. Beard[2]), Edinburgh, viel zur Behandlung von Carcinom herangezogen. 1907 machte A. Pinkuss[2]) auf seine Anwendbarkeit bei tuberkulösen Drüsenaffektionen aufmerksam und zu derselben Zeit begann Bätzner[1]), von den Eduard Müller-Jochmannschen[3]) Arbeiten über die Natur des kalten und heißen Eiters ausgehend, Trypsin in der A. Bierschen Klinik bei lokaler Tuberkulose anzuwenden. Da bei den vielen Tausend Injektionen sich nie eine Andeutung allgemeiner Intoxikationserscheinungen gezeigt hatte, da sich das Präparat als durchaus steril und haltbar und dabei von hoher tryptischer Aktivität erwies, wählten wir es als Standard-Präparat, auf das wir dann andere, direkt im Laboratorium hergestellte Extrakte bezogen.

Statt eigener Beschreibung seien die von Bätzner veröffentlichten Angaben wiederholt[4]).

„Die Injektionen werden in Glasampullen zu 1 ccm geliefert, sind auf eine sehr hohe Fermentstärke eingestellt (früher 4000, jetzt 2000 V.-I.)

---

[1]) W. Bätzner, Zur Trypsinbehandlung der chirurgischen Tuberkulose. Arch. f. klin. Chir. **92**, 1, 1911. — Lancet **1918**, S. 203.

[2]) A. Pinkuss und S. Pinkus, Die Krebskrankheit und ihre Beeinflussung durch Fermente. Med. Klin. **1907**, Nr. 28 u. 29.

[3]) Eduard Müller und A. Peiser, Über die Technik der Antifermentbehandlung eitriger Prozesse. Beitr. zur klin. Chir. **1908**, S. 236.

[4]) W. Bätzner, Arch. f. klin. Chirurgie, **95**, Heft 1.

und sind unbegrenzt haltbar. Das Präparat wird nach Angabe der Firma direkt aus den frischen Drüsen hergestellt. Es hat als Vehikel Glycerin in 60%iger Lösung. Es ist im Vergleich zu allen anderen Präparaten durch seine unbegrenzte Haltbarkeit, seine hohe tryptische Kraft, seine chemische Reinheit und seine Sterilität ausgezeichnet . . ." Die verschiedenen Trypsinproben wurden auf ihre Verdauungsstärke nach dem Verfahren von Jochmann geprüft.

Versuch vom 8. III. 1911.

I. Trypsin Fairchild. Fabrikdatum: Februar 1906. Unter meiner Kontrolle in Stubentemperatur seit Oktober 1909: 4000 V.-I.

II. Trypsin Fairchild, Präparat vom Oktober 1909: 4000 V.-I.

III. Freund & Redlich. Datum 5. I. 1911 von der Fabrik geliefert, 60 Tage alt, 32 V.-I.

IV. Trypsin Kahlbaum — frisch bereitete Lösung eines ca. 1 1/2 Jahre alten Pulvers — 32 V.-I.

V. Trypsin Merck, Lösung 1909 auf Bestellung speziell hergestellt. — 64 V.-I.

Demnach ist das Fairchildsche Präparat unbegrenzt haltbar und zeigt die stärkste Verdauung: es kann somit als zurzeit zweckmäßigstes und bestes Trypsinpräparat zum allgemeinen Gebrauch in der Fermenttherapie durchaus empfohlen werden[1] [2]).

Die Wirkungen des reinen Pankreasextraktes.

1. Die äußere, lokale Wirkung.

Die tryptisch hochaktiven Pankreasextrakte greifen bei längerer Einwirkung als Lösung oder Pulver die Epidermis nicht unerheblich an. Besonders die Arbeiterinnen, die viel mit Pankreatinpulver hantieren, verlieren die Haut an den Fingerspitzen und um die Nägel, oder wenigstens wird die Haut der Finger rissig und blutet aus kleinen punktförmigen Wunden. Dem wird leicht durch Einfetten der Finger mit Borvaseline und Waschen der Fingerspitzen mit verdünnter Weinsäure vorgebeugt. Tryptisch wenig aktiven Lösungen gegenüber verhält sich die Epidermis völlig resistent.

Da Matthes Fermentlösungen benutzte, die nur schwach verdauende Wirkung besaßen, so kann es nicht Wunder nehmen, daß er keine Wirkung auf lebendes Gewebe beobachtete und sich infolgedessen der alten Anschauung anschloß, lebendes

---

[1]) A. Pinkuss und S. N. Pinkus, Die Krebskrankheit und ihre Beeinflussung durch Fermente. Med. Klin. 1907, Nr. 28 u. 29.

[2]) W. Bätzner, Zur Trypsinbehandlung der chirurgischen Tuberkulose. Arch. f. klin. Chir. 95, 1, 1911. — Lancet 1913, S. 203.

Gewebe werde nicht angegriffen. Erst Mück[1]) und nach ihm Kirchheim[2]) sahen bei Verwendung reiner und sehr stark proteolytischer Extrakte Verdauung von lebendem Gewebe des Frosches, der Ratte und des Kaninchens (die geeignetste Stelle ist das Ohr).

Injiziert man statt unter die Haut in das Hautgewebe, so beobachtet man schon bei schwächeren Konzentrationen Entzündungen und Nekrosen, die jedoch längst nicht so bösartig sind, wie diejenigen, die der Injektion schlechter Präparate folgen. Injiziert man gesunden Menschen oder Tieren einige Kubikzentimeter eines nicht allzu aktiven Pankreasextraktes (nach unserer Terminologie nicht über 50 bis 100 V.-I.) dagegen unter die Haut und massiert die Injektionsstelle zwecks besserer Verteilung, so wirkt der Extrakt lokal überhaupt nicht. Ist Lipase vorhanden, so tritt leichte Schwellung und geringe Nekrose ein.

Erst bei hoch aktiven Lösungen (über 100 V.-I.) von Trypsin bemerkt man nach subcutaner Injektion leichte Entzündung, von geringem Ödem gefolgt. Nach eigner Beobachtung verspürt man (Notabene bei subcutaner Injektion) nur geringes, schnell vergehendes Brennen. Die Originallösung Fairchild muß mit Rücksicht auf ihren Glyceringehalt mindestens 5 bis 6, am besten 10 mal mit physiologischer Salzlösung verdünnt werden. Reiner Pankreasextrakt bringt also äußerst geringe Lokalerscheinungen hervor.

Merkwürdigerweise haben diejenigen Beobachter, die die „internen“ Wirkungen tryptisch-aktiver Lösungen untersuchten, zwar festgestellt, ob der Extrakt überhaupt verdaute oder nicht, aber die Größe der Verdauungskraft nicht quantitativ ausgewertet. Wir möchten im Gegensatz hierzu ganz besonderen Nachdruck darauf legen, daß der Unterschied zwischen der Wirkung von starken und schwachen Trypsinkonzentrationen nach der Injektion mutatis mutandis nicht weniger groß ist als zwischen verdünnter und konzentrierter

[1]) H. Mück, Experimenteller Beitrag zur Wirkung des Trypsins auf die Gefäßwand. Sammlung klinischer Vorträge **1910**, Nr. 593.

[2]) L. Kirchheim, Über die Giftwirkung des Trypsins und seine Fähigkeit, lebendes Gewebe zu verdauen. Habilitationschrift. Leipzig 1911. — Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **74**, 372, 1913.

Schwefelsäure. Der Ausdruck „hochaktives“ und „wenig“ aktives Ferment ist zu unklar, man sollte ihn gegen zahlenmäßige Ausdrücke eintauschen.

2. Die Wirkung bei intravenöser Injektion.

Injiziert man Kaninchen, so wie es Kirchheim getan, große Mengen Extrakt von hoher proteolytischer Wirkung intravenös (Kirchheim injiziert Kaninchen 20 ccm hochaktiven Pankreasextrakts), so schreien die Tiere ungefähr 10 Minuten nach der Injektion plötzlich auf, blutiger Schaum tritt aus dem Munde und sie gehen unter den Erscheinungen des Lungenödems zugrunde. Man sieht dann, daß von der Injektionsstelle in dem Blutgefäß ausgehend alle Gefäße bis zum Herzen hin und der ganze kleine Kreislauf richtig angedaut sind. Überall finden sich profuse Blutungen. Es gelang mit Hilfe unserer Auswertungsmethode nachzuweisen, daß, wenn diese Erscheinungen eintreten, das Blut auf der Gelatineplatte eine Delle hinterläßt, also freies aktives Trypsin enthält.

Wie wichtig es ist, die im Blute vorhandenen Mengen aktiven Ferments messend zu verfolgen, zeigt sich gerade bei diesen intravenösen Injektionen, die an 14 Tieren ausgeführt wurden. Die früheren Autoren, die die Verdauung einer Fibrinflocke als Maßstab benutzten, waren nicht in der Lage, selbst beträchtliche Unterschiede im Fermentgehalt aufzufinden. Ein Beispiel soll unser Vorgehen erläutern:

Wir entnahmen einem normalen Kaninchen 1 Tropfen Blut und fanden, daß 3 Ösen von dem Blut vermischt mit einer Öse einer 100-wertigen Extraktlösung auf der Gelatineplatte gerade unwirksam ist. Da ein Kaninchen von 2 kg sicher weniger als 180 ccm Blut beherbergt, wären zur Neutralisierung des gesamten, im Blut enthaltenen Antitrypsins höchstens 60 ccm der gleichen Extraktlösung von 100 V.-I. oder 6000 V.-I. erforderlich. Injizieren wir diese Menge, am besten in konzentrierter Form, intravenös, so zeigt das Blut unmittelbar (1 bis 2 Minuten) nach der Injektion aus der Carotis der Ohrvene entnommen kein aktives Ferment auf der Platte an. Merkwürdigerweise zeigt aber auch der Antitrypsingehalt des Blutes keine erhebliche Abnahme. Wollen wir nun in der Zirkulation einen Überschuß von aktivem Ferment erzeugen, so müssen wir im vorliegenden Fall eine so große Menge von Extraktlösung injizieren, daß in einem Tropfen der 180 ccm betragenden Blutmenge schon mindestens eine „Einheit“ enthalten ist. Das Experiment ergibt, daß auch jetzt noch keine Wirkung

auf der Platte zu sehen ist. Weitere Versuche zeigten, daß man das 4, ja 10 bis 50 fache der absättigenden Menge des Extraktes intravenös injizieren muß, um im Blut aktives, verdauendes Ferment zu haben. (Es ist wohl unnötig zu sagen, daß die injizierten Flüssigkeitsmengen nicht etwa 60 ccm betrugen, sondern daß man höchstens bis zu 15 ccm der Lösungen, die entsprechend höhere Verdauungswirkung hatten, injizierte.)

Nie standen die Mengen Trypsin, die die akuten schweren Vergiftungserscheinungen hervorriefen, in einfacher Beziehung zu der im Blute vorhandenen Menge Antitrypsin. So beobachteten wir, daß die Andauung des Gefäßapparates bei Tieren, die 1 bis 2 Tage hungerten, erst nach größeren Dosen als bei normalen gut gefütterten eintrat, dagegen bei lang hungernden, kurz vor dem Exitus stehenden, viel schneller. Man muß hier an das Vorhandensein von Reserven denken, die erst allmählich in das Blut gelangen, das, wie in allen anderen Funktionen, möglicherweise auch in bezug auf den Antitrypsingehalt nach einem gewissen Gleichgewichte strebt. Haben doch die Untersuchungen Briegers und seiner Mitarbeiter ergeben, daß während der Verdauung, speziell während der Höhe, der Antitrypsintiter des Blutes beträchtlich ansteigt, um dann wieder das gewohnte Niveau zu erreichen. Dieses ist bei gesunden Menschen merkwürdig gleichmäßig, so gleichmäßig, daß, nach persönlicher Mitteilung, Brieger gegenwärtig den Titer seiner Trypsinlösungen mit dem Titer des Antitrypsins des normalen Blutes einstellt. Schon Burckhardt[1]) hatte 1883 nachgewiesen, daß beim Hungern die antitryptische Kraft des Serums (die vorher Cathcart und Tiegel[2]) nachgewiesen hatten) herabgeht. In gewisser Analogie hierzu steht, daß Jane Claypon und Schryver[3]) im extremen Hungerzustande eine gegen die Norm beträchlich gesteigerte Autolyse der Gewebe fanden[4]). Wir möchten hier nur auf das außerordentlich Komplizierte dieser Verhältnisse hinweisen, auf deren nähere Analyse wir

---

[1]) Burckhardt, Schmiedebergs Archiv. **16**, S. 322, 1883.

[2]) Tiegel, Arch. f. d. ges. Physiol. **23**, 278, 1880.

[3]) J. E. Lane Claypon and S. B. Schryver, Some researches on the autolytic degradation of tissues. Part. I. Journ. of Physiol. **31**, 169, 1904. — S. B. Schryver, Part. II. Ib. **32**, 159, 1905.

[4]) Es ist denn auch neuerdings Fr. N. Schulz gelungen, im Blute von Kaninchen, die prämortale Steigerung der Stickstoffausscheidung zeigten, spezifische, auf Muskel eingestellte proteolytische Fermente nachzuweisen. Münch. med. Wochenschr. **1913**, Nr. 45.

gelegentlich einer im Gange befindlichen Untersuchung über die Bildung der Antifermente zurückzukommen hoffen.

Protokoll.

An 2 Kaninchen wurde das Blut auf seinen Antitrypsingehalt untersucht. Da nach mündlicher Mitteilung Herrn Geh. Rat *Briegers* das Gesamtblut annähernd dieselben Titer zeigt wie verschiedene Proben des Plasmas, so verfuhren wir bei der Untersuchung wie folgt: Das Blut wurde den Tieren aus der Ohrvene entnommen und mit der gleichen Menge einer 10% Natriumcitrat und 20% Glycerin enthaltenden Lösung vermengt. Es hemmten in 9 Fällen 4 Teile Blutlösung einen Teil einer Trypsinlösung von 200 V.-I. Die Tiere wogen 1800 bis 2200 g. Zwei recht schwache Tiere, die an dem bekannten Kaninchenschnupfen litten, zeigten erhöhten Antitrypsintiter: 1 Teil verdünntes Blut hemmte in 1 Falle 2, im anderen 4 Teile Trypsin. Die Normaltiere zeigten demnach auf unverdünntes Blut berechnet eine Hemmung von $200 : {}^4/_2 = 100$ V.-I., die anderen von 400 resp. 800 V.-I. Der Blutgehalt des Kaninchens, der zu 5 bis 9% des Körpergewichts bestimmt ist, wurde *der Bequemlichkeit halber* zu 10% angenommen.

Versuch.

Gesundes, gut gefüttertes Tier, Gewicht 1800 g, Antitrypsintiter 100 V.-I. In 180 ccm demnach diejenige Hemmungswirkung, die 1 ccm Trypsin von 18000 V.-I. neutralisieren würden. Wir hatten für diesen Versuch eine Trypsinlösung von ca. 20000 V.-I. hergestellt, so daß jeder Kubikzentimeter nicht nur genügen mußte, um alles im Blute enthaltene Antitrypsin abzusättigen, sondern es hätten in vitro die nach Absättigung überbleibenden 2000 V.-I. mit den 180 ccm Flüssigkeit verdünnt immer noch etwa 10 V.-I. gehabt, genug, um eine sehr tiefe Delle auf der Gelatineplatte zu geben. Dem Tiere wurde in Rückenlage in ganz leichter Äthernarkose die Carotis ext. und V. jugularis freigelegt und in letztere die Injektionskanüle eingebunden, dann die Narkose unterbrochen. Es wurde nun 1 ccm der Trypsinlösung eingespritzt (kalt, da das warme, so hochwertige Trypsin die Gefäße zu leicht durchfrißt) und gleich darauf sowohl aus der Jugularis, Carotis wie aus der Randvene des Ohres Blut entnommen und ausgewertet. Die Blutentnahme wurde jede zweite Minute wiederholt. Als nach 10 Minuten keine Reaktion am Tier zu bemerken war, wurden von neuem 2 ccm der obigen Trypsinlösung eingespritzt und schnell mit physiol. Kochsalzlösung nachgewaschen. In diesem Falle schrie das Tier nach etwa 7 Minuten plötzlich auf, streckte sich unter Ausscheiden blutigen Schaums aus Mund und Nüstern und ging zugrunde. Auch hier waren Blutproben wie oben entnommen worden. Die nach der ersten Injektion von 20000 V.-I. entnommenen Blutproben hatten noch immer einen antitryptischen Titer entsprechend 100 V.-I., während das nach der zweiten Einspritzung entnommene Blut *selbst* ohne Trypsinzusatz eine deutliche Delle gab. Es waren somit im ganzen

60000 V.-I. im Kubikzentimeter zugeführt worden, etwa 3,5 mal mehr als genügen würde, um das gesamte im Blut enthaltene Antitrypsin abzusättigen.

Es sei also nochmals darauf hingewiesen, daß wir diese Andauung der Blutgefäße mit ihren Folgen nur dann beobachteten, wenn das Blut allein auf der Gelatineplatte eine Delle gab, wenn somit freies Trypsin im Kreislauf vorhanden war, oder vielmehr, daß immer, wenn diese Erscheinungen eintraten, freies Trypsin im Blute nachgewiesen werden konnte.

Auch Kirchheim weist in seiner neuesten Veröffentlichung nach, daß die beschriebene „Giftwirkung" eine Funktion der Trypsinwirkung ist, indem er zeigt, daß, wenn das Trypsin durch Erhitzen zerstört oder durch Zusatz von Antitrypsin haltendem Pferdeserum neutralisiert wird, diese Wirkungen ausbleiben. Wenn er aber weitere Vergiftungserscheinungen von der Art des anaphylaktischen Choks nach intravenöser Injektion gewisser Trypsinmengen (die Wirkungsstärke ist nicht quantitativ ausgewertet) beschreibt, wobei die Blutgefäße keine Läsion zeigten, so läßt sich schwer entscheiden, inwieweit andersartige Beimischungen die Lungenblähung, das Sinken der Temperatur, Leukopenie usw. hervorgebracht haben. Zu berücksichtigen ist allerdings, daß Kurt Meyer[1]) die Angabe Pfeiffers bestätigt hat, nach der unmittelbar nach Auslösung des echten anaphylaktischen Choks der antitryptische Titer sinkt und dann schnell wieder ansteigt.

Vorläufig erscheint durch unsere Untersuchungen ein weiterer Beweis geliefert, daß der Organismus sich gegen die Wirkungen des tryptischen Ferments nur durch seine Antifermente schützt, die vollkommen genügen, um die normalerweise auftretenden Mengen freien Ferments zu inaktivieren. Das Antiferment ist im Blut und in der Lymphe enthalten. Daher werden schlecht versorgte Gebiete, wie das Kaninchenohr, so angefressen, als ob sie totes Eiweiß wären. Man kann sich dabei des Eindrucks nicht erwehren, daß sich diese Wirkung vor allem auf die Blutgefäße erstreckt. Besonders frappant tritt dies an der Froschzunge zutage, wie es Mück beschreibt. Bei sehr aktiven Lösungen (die Wertigkeit, die notwendig ist, wechselt mit dem Substrat), verwischt sich diese Erscheinung.

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Ther. 1, Heft 2.

Andererseits erhöht jede Maßnahme, die lokal den Zufluß des Blutes oder der Lymphe verstärkt, auch die Resistenz des Gewebes. Spritzt man z. B. in beide Ohren eines Kaninchens je 1 ccm eines 100 V.-I.-wertigen Pankreasextraktes und erwärmt das eine Ohr nach der Injektion wenige Minuten mit heißer Luft oder einer Glühlampe, so wird das unbehandelte Ohr im Laufe der nächsten Tage glatt durchgefressen, während das erwärmte bis auf eine unbedeutende Induration intakt bleibt. Es wird hier demnach das Ohr durch Hyperämisierung geschützt; denn daß durch die Erwärmung das Ferment selbst zerstört wäre, ist selbstredend ausgeschlossen. Unwillkürlich wird man hier an die älteren Versuche erinnert, Beulen aller Art, Diphtheriemembranen u. a. durch Fermente (Pepsin, Trypsin, Papayotin) zu verdauen. Auch die Versuche der v. Leydenschen Schule, die an Tumoren, nur mit unzulänglichem Material, unternommen wurden, sind noch in frischer Erinnerung. Vielleicht würde ein Versuch mit aktiveren, reineren Präparaten, gestützt auf neuere Erfahrungen, auch hier zu besseren Resultaten führen.

Was die von Kirchheim[1]) beschriebenen Veränderungen des Blutbildes anbetrifft, so muß ein so gewaltsamer Eingriff selbstverständlich an sich schon ohne weiteres das Blutbild völlig verändern. Kirchheim beobachtete nach Injektion „großer“ Mengen seines Pankreasextrakts Leukopenie, während nach unseren Beobachtungen und denen anderer Forscher Injektionen, die nicht so starke, plötzliche Veränderungen im Kreislauf hervorrufen, stets Hyperleukocytose (bei Tuberkulose und manchmal auch bei Krebs starke Eosinophilie) bewirken. Auch berichtet Kirchheim von einer Verzögerung der Gerinnbarkeit des Blutes nach Trypsininjektionen. Nun ist die Beweiskraft solcher Versuche mit einem Stoff, der die Blutgefäße nachweislich stark angreift, sehr angreifbar. So war uns bei Benutzung von Lösungen unter 200 V.-I. mitunter, speziell nach einigen Injektionen, eine erhöhte Gerinnbarkeit des Blutes aufgefallen, während bei Benutzung sehr starker Lösungen (2000 bis 4000 V.-I.) in größeren Mengen die Gerinnbarkeit des Blutes bei verschie-

[1]) L. Kirchheim, Über die Giftwirknng des Trypsins und seine Fähigkeit, lebendes Gewebe zu verdauen. Habilitationsschrift. Leipzig 1911. — Arch. f. experim. Pathol. und Pharmakol. 74, 374, 1913.

denen Tieren (vielleicht im Zusammenhang mit dem Ernährungszustand) verschieden beeinflußt wurde. Interessant erscheint dafür folgender Versuch:

Einem Kaninchen von 2500 g wurden 2 ccm einer Lösung zu 250 V.-I. in die Carotis externa eingeführt, das Tier kam nach ganz kurzer Dyspnoe rasch wieder zu sich. Die Koagulabilität des Blutes erschien fast unverändert. Darauf wurden dem Tier 5 ccm einer Lösung von 2500 V.-I. in die Carotis gespritzt, die das Tier augenblicklich töteten. Das Blut in den Arterien war geronnen, und auch das Herz so voll von Gerinnseln, daß es kaum gelang, einen Tropfen zu entnehmen, der dann auf der Gelatineplatte eine Delle ergab. Mithin, je nach der Art der Injektion und des angewandten Materials, ein anderes Ergebnis!

Wir möchten diese Kapitel nicht abschließen, ohne ein Mißverständnis aufzuklären, das in die Bewertung der physiologischen Wirkung von Pankreasextrakten nachgerade reichlich Verwirrung hineingebracht hat. Bekanntlich kamen v. Bergmann, Guleke u. a. (vgl. G. v. Bergmanns zusammenfassenden Bericht. Medizinische Klinik 1909, S. 50, auch Kirchheim und Mück, l. c.) auf Grund sehr eingehender Untersuchungen zu der Ansicht, daß „die Todesursache bei der Pankreasnekrose auf eine tödliche Vergiftung mit Trypsin bzw. Pankreassekret zurückgeführt werden kann". v. Bergmann bewies darauf, daß Versuchstiere durch Vorbehandlung mit Trypsinpräparaten (und auch den aus diesen bereiteten gänzlich inaktiven Dekokten) vor der tödlichen Giftwirkung geschützt werden konnten; die Vergiftung trat aber ein, wenn man die von ihm benutzten Trypsinpräparate den Tieren in die Bauchhöhle spritzte. v. Bergmann bemerkt hierzu mit voller Einsicht in die Schwierigkeit der Deutung dieser Verhältnisse sehr vorsichtig, daß „die Ursache der Vergiftung ein unbekannter Stoff im Pankreassekret ist". Das ist nicht unwahrscheinlich, wenn man berücksichtigt, daß, wie bereits erwähnt, der Pankreasfistelsaft, der doch schließlich dem normalen Sekret der Drüsenzelle am nächsten kommen sollte, bei der geringsten Reizung des operierten Tieres intensiv toxisch werden kann. Auf keinen Fall kann aber auf Grund dieser Versuche dem Trypsin ganz allgemein ohne Rücksicht auf die Dosis und die Herkunft des

Präparates neben seiner proteolytischen Wirksamkeit eine allgemeine Giftigkeit nachgesagt werden.

Es besteht eben sowohl bei der subcutanen, wie bei der intravenösen Einführung proteolytisch aktiver Pankreasextrakte der gleiche Unterschied zwischen den enormen von Kirchheim und uns verwendeten Fermentmengen und den relativ niedrigen Dosen, die therapeutisch verwendet werden und dabei, allerdings nur im pathologisch veränderten Organismus, charakteristische Erscheinungen hervorbringen. Eigentlich hat die Wirkung so übergroßer Trypsinmengen therapeutisch-klinisch kein anderes Interesse, als daß sie besonders prägnant diese Differenz zwischen konzentrierten Lösungen einerseits und den therapeutisch in Betracht kommenden Mengen andererseits demonstriert. Es ist daher in der Tat unrichtig, wenn man aus den subcutanen oder intravenösen Injektionsversuchen mit den großen Fermentmengen verallgemeinernd den Schluß zieht, Pankreasextrakt sei giftig, und es ist bedauerlich, wenn dieses Urteil die Anwendung eines exakt dosierbaren und therapeutisch vielleicht wertvollen Agens verzögert[1]).

3. Die Allgemeinwirkung kleiner, den therapeutischen Dosen entsprechender Pankreasextraktmengen.

Beim gesunden Menschen rufen Mengen bis etwa 4 ccm eines 2200wertigen Extraktes, subcutan injiziert, keinerlei Allgemeinstörungen hervor, anders bei Tuberkulösen und Krebskranken[2]) [3]) [4]) [5]). Hier treten, jedoch nur nach wiederholten Injektionen, mitunter sehr stürmische Intoxikationserscheinungen ein: Temperaturerhöhung, Schwindel, selbst Ohnmacht und Kollaps, Übelkeit bis zum Erbrechen, Kreuzschmerzen usw.

---

[1]) Das einzige, was wir mit großen Dosen noch der Untersuchung wert halten, ist die lokale Schädigung einzelner Organe und die Nachforschung, ob sich in der Folge spezifische Abwehrfermente entwickeln.

[2]) A. Pinkuss und S. Pinkuss, Die Krebskrankheit und ihre Beeinflussung durch Fermente. Med. Klin. **1907**, Nr. 28 und 29.

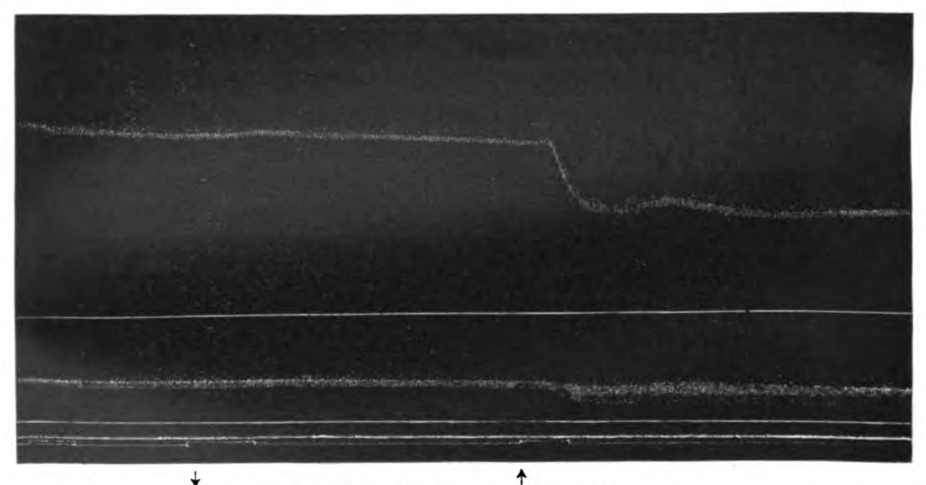
[3]) M. A. Cleaves, The physiological action of the pancreatic enzymes. Medical Record. New York, June 1, 1907.

[4]) W. Bätzner, Zur Trypsinbehandlung der chirurgischen Tuberkulose. Arch. f. klin. Chir. **95**, 1, 1911. — Lancet **1913**, 203.

[5]) F. W. Lamballe, The utility of enzymes in malaria. Medical Record. Nov. 22, 1913.

Zeitlich fallen diese Erscheinungen zusammen mit dem Auftreten lokaler Reaktion an dem pathologisch veränderten Gewebe. Sie lassen sich wohl auf die Resorption abgebauten Zerfallmaterials zurückführen. Es ist für das Auftreten der Reaktionen nicht unbedingt notwendig, daß die Injektion direkt in das erkrankte Gewebe geschieht. Nach Baetzner dokumentiert sich die Reaktion sowohl bei Tuberkulose wie bei Tumoren als starke Hyperämie innerhalb des erkrankten Gewebes und um dasselbe; Krebsknoten schwellen innerhalb einer stark errötenden Umgebung, torpide tuberkulöse Eiterungen fangen an zu bluten und bilden frische Granulationen usw. An der Stelle der Injektion ist gewöhnlich nichts zu bemerken. Nur in einem Falle sehr vorgeschrittenen Krebsrezidivs schmerzten nach jeder neuen Injektion alle früheren Injektionsstellen.

Es handelte sich somit hier um deutlich ausgesprochene Wirkungen, die eine weitere experimentelle Analyse erwünscht erscheinen ließen. In Berücksichtigung der klinischen Verwendung, bei der Menschen höchstens 60 V.-I. pro Kilogramm injiziert wurden, injizierten wir den Tieren (Katzen und Kaninchen) höchstens 30 V.-I.



↓ ↑

Fig. 1. Katze, 3400 g. Äther-Äthylurethannarkose.
Obere Kurve: Quecksilbermanometer. Untere Kurve: Gad-Cowlscher Apparat. Zeitschreibung 1″.
↓ Intravenös 2 ccm reine 6%ige Glycerinlösung.
↑ Intravenös 2 ccm Extrakt, 200wertig.

Injiziert man dem Tier intravenös Mengen von $^{1}/_{2}$ bis 3 ccm unseres 200 wertigen Extraktes (6 $^{0}/_{0}$ Glycerin enthaltend), so folgt starke Senkung des Blutdrucks [man tut gut, sehr langsam zu injizieren (s. Fig. 1)] und ganz wie nach Injektion von inaktivem Pankreasextrakt „ein mächtiger Hyperdikrotismus"[1]) (Balint und Molnar), Anwachsen der systolischen Erhebungen, hindeutend auf hochgradige Entspannung der Gefäßwand. Eine Dilatation der Blutgefäße hat übrigens auch Mück (l. c.) beobachtet.

Bei der Prüfung am isolierten Froschherzen[2]) in dem Jakobjschen Apparat zeigte sich Zunahme des Schlagvolumens fast um das Doppelte (s. Fig. 2). Auch Balint und Molnar fanden mit dem Vierordtschen Tachometer beim Kaninchenherzen eine Zunahme des Schlagvolumens von 2,5 auf 4.

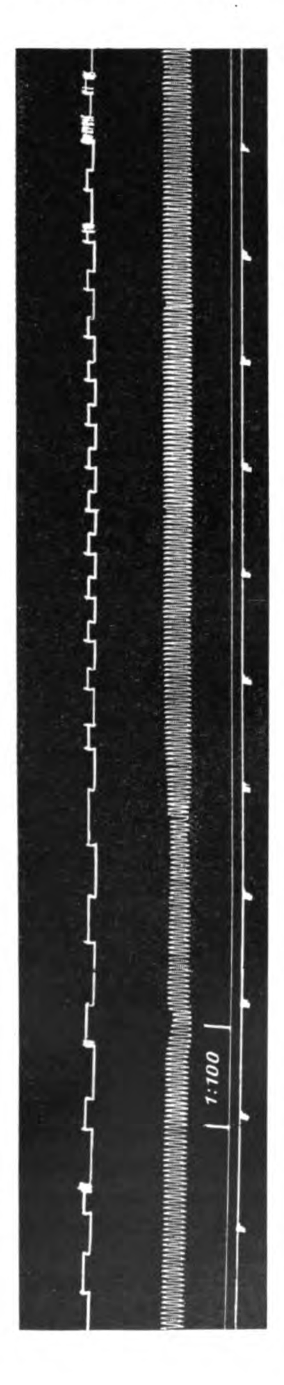


Fig. 2. Prüfung der Wirkung am isolierten Herzen einer 55 g schweren Esculenta in dem Jakobjschen Apparat. Durchströmung mit Ringer-Gummi-arabicum-Lösung. Überdruck 25 mm Wasser. Flüssigkeitsstrom gemessen mit der Jakobjschen Stromuhr.
Obere Reihe: Geförderte Menge Flüssigkeit. Mittlere Reihe: „Blutdruck" am Quecksilbermanometer.
Dritte Reihe: Zusatz von Extrakt 1 : 100 verd. = 20 wertig. Untere Reihe: Zeitschreibung in Minuten.

---

[1]) d. h. erhöhte Dikrotie.

[2]) Wegen der Einzelheiten vgl. Th. A. Maaß, Über das Verhalten von Dichlorisopropylalkohol-Carbaminsäureester (Aleudrin). Diese Zeitschrift **1912**, 81.

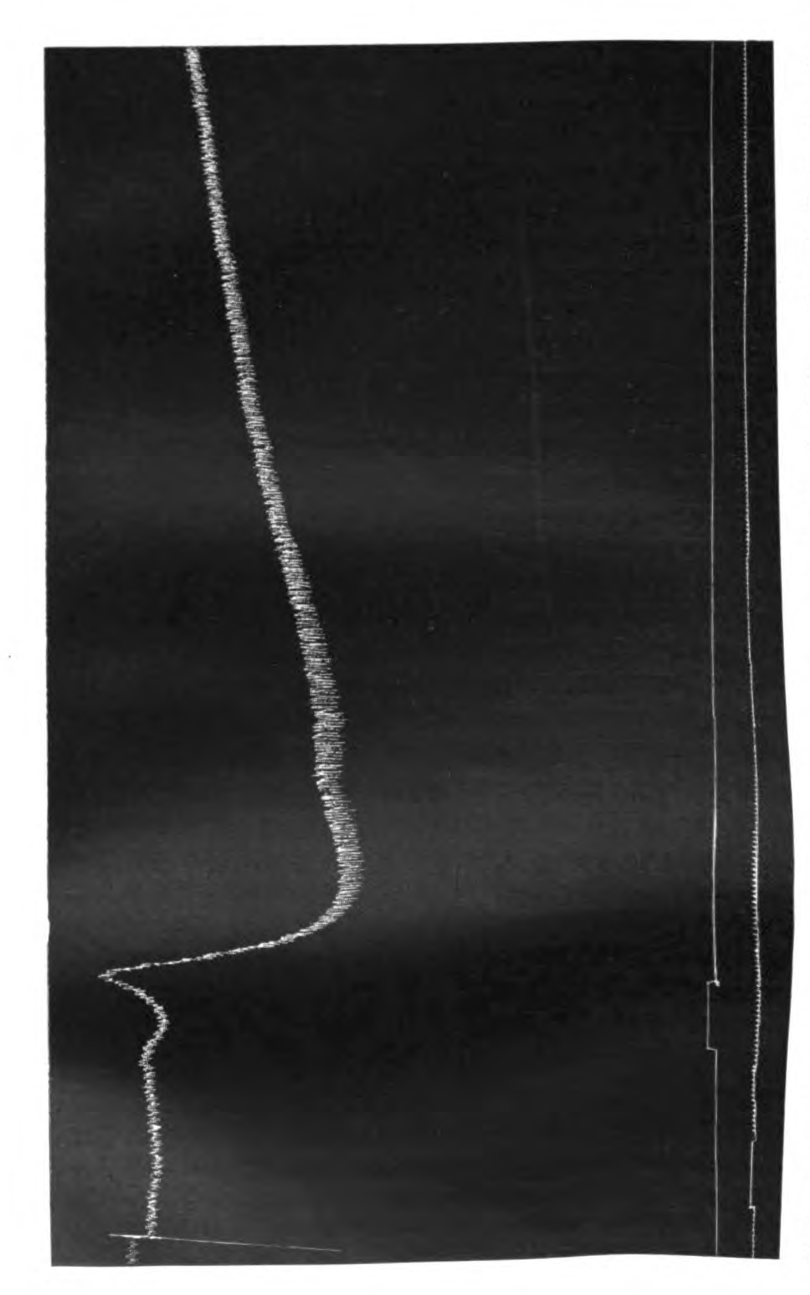


Fig. 3. Katze, 3450 g (voller Magen). Äther-Urethannarkose. Injektion in die V. femoralis nach Exstirpation des Magendarmkanals. Blutdruck am Quecksilbermanometer.

Die Kreislaufwirkung ist nicht allein zentral bedingt, denn sie tritt in gleicher Weise beim nach Sherrington decerebrierten Tier, oder nach Trennung des Gehirns vom Rückenmark ein. Wenn man nach Jackson in die Gehirnarterien Chloroform einspritzte und so das Gehirn ausschaltete, sah man die Blutdrucksenkung durch den Extrakt besonders schön. Vorherige Injektion von Atropin oder Durchtrennung der Vagi war ohne Einfluß. Erweiterung der Darmgefäße ist an der Blutdrucksenkung nicht allein schuld, denn die Senkung tritt gleichfalls auf bei Tieren, denen der Magendarmkanal mitsamt der Milz entfernt war (Fig. 3).

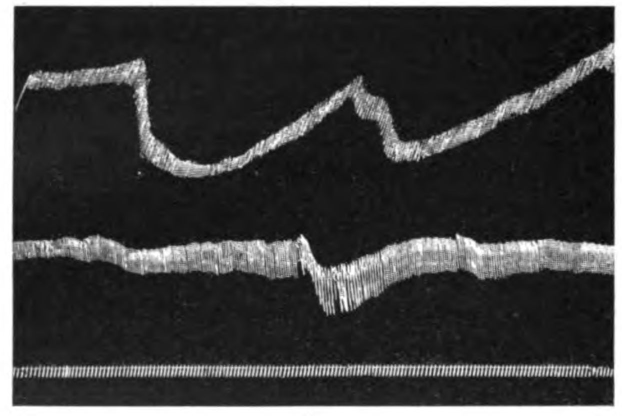
Wiederholte Injektionen ergaben immer etwa gleich intensive Senkungen — zum Unterschied von wiederholten Injektionen von Albumoselösungen oder verunreinigten Organextrakten. Von der Cholinwirkung unterscheidet sich die Pankreasextraktwirkung dadurch, daß Atropin die Blutdrucksenkung nicht in Steigerung verwandelt, ferner auch dadurch, daß beim Pankreasfistel-Hund keine wesentliche Steigerung der Drüsenabsonderung eintrat. Übrigens bewirken unreine Extrakte bekanntlich eine ungemeine Zunahme der Drüsentätigkeit.

Der Verlauf der Blutdruckkurve, bei der in der Tiefe der Senkung und während des Anstiegs starke Pulse hervortreten, die noch längere Zeit anhalten, deutet zusammen mit dem Gesagten darauf hin, daß der Pankreasextrakt eine Dilatation aller peripherischer Gefäßgebiete hervorbringt.

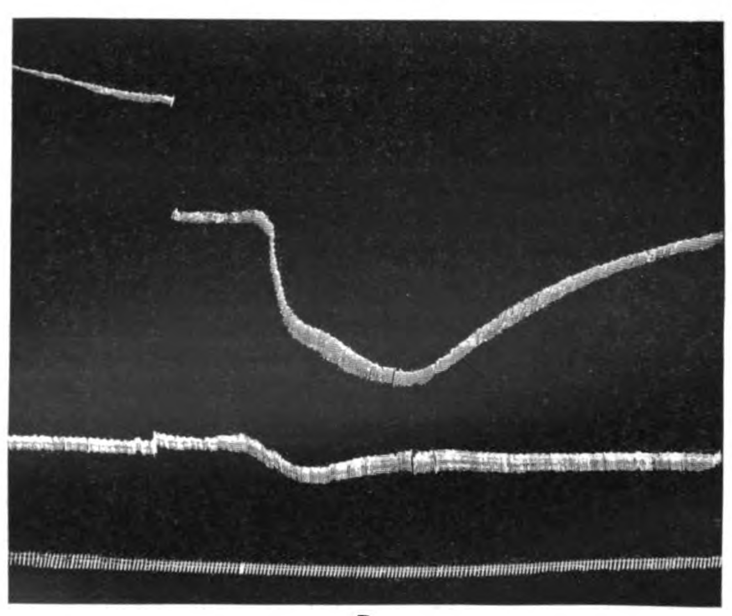
Interessanter ist die Wirkung auf die Darmmuskulatur, die wir, in situ nach der Starlingschen Ballonmethode, am Plethysmogramm und nach Trendelenburg[1]) untersuchten. Hier zeigte sich nämlich ein bemerkenswerter Unterschied vom gefütterten und hungernden Tier. Während beim hungernden Tier Pankreasextraktinjektion Nachlassen des Tonus während der Dauer der Senkung des Blutdruckes, ganz wie nach Injektion von Albumosen, hervorbrachte (Fig. 4), nahm der Tonus zu, wenn das Tier sich auf der Höhe der Verdauung befand oder wenn vorher durch Albumoseinjektion lebhafte Peristaltik hervorgerufen war (Fig. 5).

Im letzten Fall waren noch lange Zeit nachher die Darmgefäße stark mit Blut gefüllt. Wir glaubten nun, daß wir das gleiche durch vorhergehende Injektion von „Hormonal“ erzeugen

[1]) P. Trendelenburg, Eine neue Methode zur Registrierung der Darmtätigkeit. Zeitschr. f. Biol. **61**, 67.



A



B

Fig. 4. Katze, 2700 g, hungernd. Äther-Urethannarkose.
Obere Reihe: Darmplethymogramm.
Untere Reihe: Blutdruck nach Gad-Cowl gemessen.
A. Injektion von Albumose. B. Injektion von 2 ccm Pankreasextrakt (V.-I. 200).

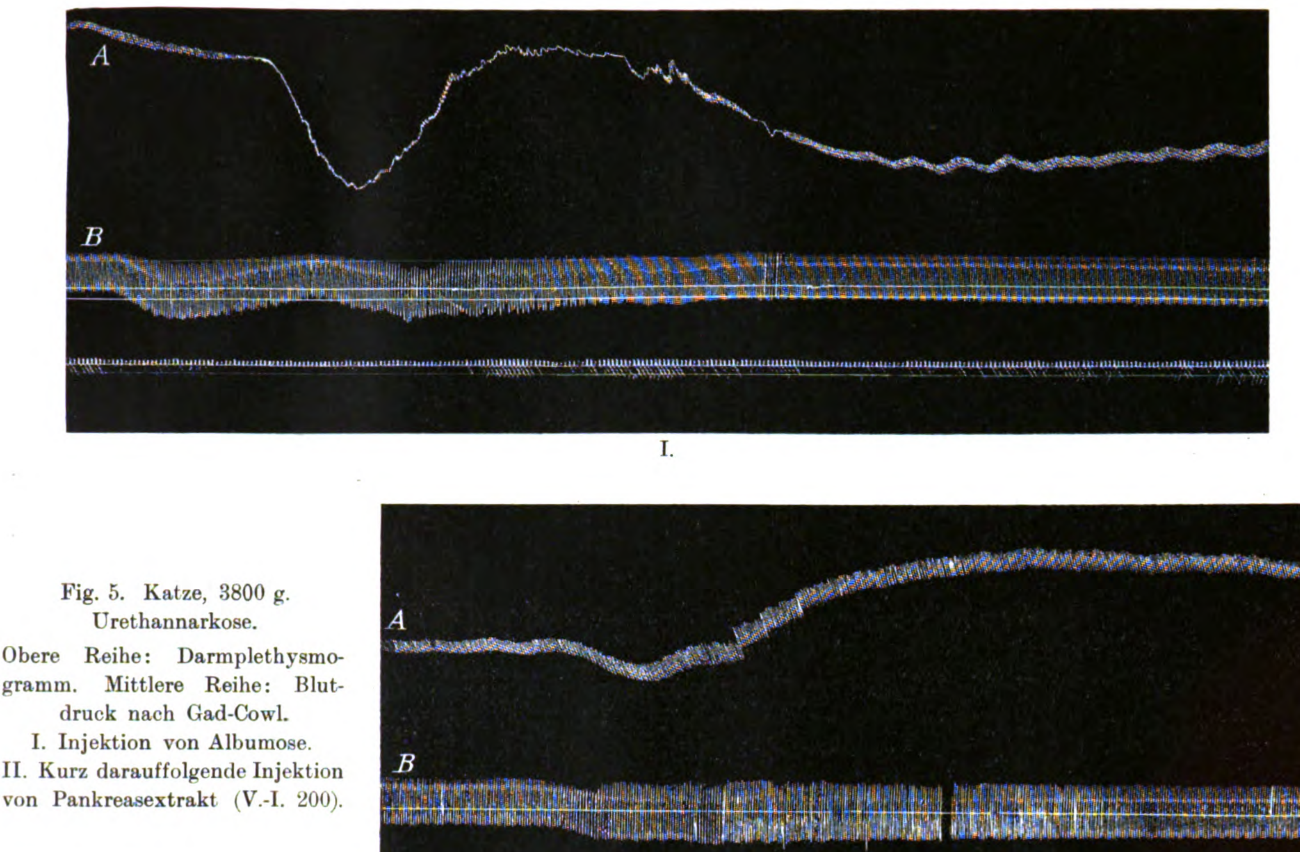


Fig. 5. Katze, 3800 g. Urethannarkose.
Obere Reihe: Darmplethysmogramm. Mittlere Reihe: Blutdruck nach Gad-Cowl.
I. Injektion von Albumose.
II. Kurz darauffolgende Injektion von Pankreasextrakt (V.-I. 200).

könnten und sahen zu unserem Erstaunen, daß die durch Hormonal lebhaft entwickelte Peristaltik durch Pankreasextraktinjektion aufgehoben wurde (Fig. 6). Diese Aufhebung und das Wiederhervorrufen der Peristaltik ließ sich 3 bis höchstens 4 mal wiederholen. Endlich versagte die Wirkung des Pankreasextraktes, der Darm reagierte auf Hormonalinjektion wiederum in kräftiger Weise.

Protokoll zur Hemmung der Hormonalwirkung durch Pankreasextrakt: Katze, 2850 g, wurde in Äthernarkose nach Jackson[1]) durch Einspritzen von Chloroform in die rechte A. vertebralis und A. carotis ext., nach Durchschneiden beider Vagi „decerebriert" künstlich geatmet und sorgfältig warm gehalten. Gleich nach der Decerebrierung wird weiter operiert.

Zur Kontrollierung der Darmbewegungen wurde ein über einen kurzen, dünnen, doppelläufigen Katheter gezogener Ballon aus Condomgummi benutzt. Das eine Zuführungsende des Katheters wird mit einem Wassermanometer durch einen Druckschlauch verbunden und die Bewegung der Wassersäule vermittels eines Maßschen Bellow-Recorders registriert. Ballon und Verbindung bis zum Barometer sind mit Wasser gefüllt. Man macht einen möglichst kleinen Schnitt in das Jejunum, schiebt den noch nicht aufgeblasenen Ballon hinein, legt zwei kleine Nähte durch den Schnitt und einen kleinen Gummiring, den man auf den Metallteil des Katheters geschoben hat, vernäht die Bauchwunde und läßt durch das freie Zuführungsende so viel warmes Wasser hinzu, daß, nach Starlings Vorschrift, das Manometer ungefähr 30 bis 40 cm Druck anzeigt. 20 bis 30 Minuten später wird das Hormonal in die Beinvene gespritzt. Wir bedienten uns einer uns freundlichst von Dr. Zülzer selbst zur Verfügung gestellten sehr wirksamen Hormonallösung und injizierten in diesem Falle 2 ccm.

Anfang des Versuches: 11^h 40′; 2 ccm Hormonal. Präparat Zülzer mit 3 ccm physiologischer Salzlösung verdünnt, in die Beinvene gespritzt. Atmung völlig gleichmäßig.

11^h 52′: Einige Bewegungen des Darmes.

12^h 03′: Ganz abrupt, starke peristaltische Wellen, die 2 Minuten anhalten.

12^h 07′: Erneute starke peristaltische Bewegungen, bei deren Beginn gleich 1 ccm Injectio Trypsini Fairchild, mit 5 ccm physiologischer NaCl verdünnt, intravenös eingespritzt wird. Die Bewegungen des Darmes sistieren nach etwa 10 Sekunden.

Bis 12^h 02′, nachdem die nach Trypsin etwas vertiefte Atmung sich wieder auf die Norm eingestellt hat, keine Darmbewegungen, dann wieder vereinzelte Wellen, die sich schnell legen.

---

[1]) Jackson, Experimental cephalic Coma. Journ. of experim. Pharmakol. and Ther. 4, Nr. 1, Sept. 1912.

Die Injektion von 1 ccm des Hormonals, vermischt mit $^1/_2$ ccm Injectio Trypsini, verdünnt mit 5 ccm physiologischer Salzlösung bleibt bis $12^h 45'$ ohne Wirkung.

$12^h 48'$: 1 ccm Hormonal, verdünnt mit 4 ccm physiologischer Salzlösung.

$12^h 53'$: Energische Ausschläge, die sich nach Injektion von verdünntem Injectio Trypsini w. o. legen.

$1^h 00'$: Wieder Peristaltik, die wieder durch Injektion von $^1/_2$ ccm verdünnter Injectio Trypsini unterdrückt werden.

Bis $1^h 38'$ bleibt der Darm, abgesehen von seltenen Wellen, ganz ruhig. Es wird die Atmung abgestellt, um leichte Dyspnoe zu erzeugen, die die Bewegungen des Darmes zu begünstigen pflegt; alsbald zeigen sich ziemlich andauernde peristaltische Wellen, die in 2 bis 3 Minuten langen Pausen in Intervallen von 10 bis 50 Sekunden eintreten.

$1^h 50'$: Während der dritten Serie der peristaltischen Wellen wird $^1/_2$ ccm verdünnte Injectio Trypsini injiziert. Die Bewegung wird nach einer Latenz von 8 Sekunden nur auf 3 Minuten unterbrochen, worauf sie wieder auftreten.

$1^h 58'$: $^1/_2$ ccm verdünnte Injectio Trypsini. Bewegungen coupiert, setzen bald wieder ein.

$2^h 12'$: 1 ccm verdünnte Injectio Trypsini injiziert, beseitigt die Bewegungen. Das Tier wurde nun energischer durchlüftet, dann die künstliche Atmung kurz abgestellt (dieses Tier atmete ganz kurze Zeit spontan, was nicht immer eintritt), dann der Luftzutritt $^1/_2$ Minute abgeschlossen, bis das Tier deutlich dyspnoisch wurde. Hierauf

$2^h 20'$: 1 ccm Hormonal injiziert.

$2^h 35'$: Energische peristaltische Wellen, die selbst durch 4 malige Injektion von je 1 ccm verdünnter Trypsinlösung nicht sistiert werden konnten. Adrenalin legte die Bewegung augenblicklich still, aber nur auf 2 Minuten.

$3^h 10'$: Die Bewegungen des Darmes dauern fort und lassen sich auch durch Adrenalin nur auf ganz kurze Zeit coupieren.

Bis 4^h: Die Darmbewegungen in Abständen von 2 bis 10 Minuten sind noch immer zu beobachten.

Dieses Wechselspiel von Hormonal und Trypsin ist ganz unabhängig von den Blutdruckschwankungen, da Hormonal ja auch starke Blutdrucksenkung hervorruft und trotzdem die Darmwirkung manchmal schon während der Injektion vor der Drucksenkung einsetzt. Es ist vielmehr eine rein peripherische, die Elemente des Darmes betreffende Wirkung. So wirkt auch Adrenalin hemmend auf die Hormonalwirkung ein, während es doch gleichzeitig den Blutdruck im entgegengesetzten Sinne beeinflußt. Auffallend ist aber, daß Adrenalin sofort im Moment der Injektion die Bewegungen des Darmes stillstellt, während Pankreasextrakt immer erst nach einigen Sekunden Latenz wirkt (s. Fig. 7).

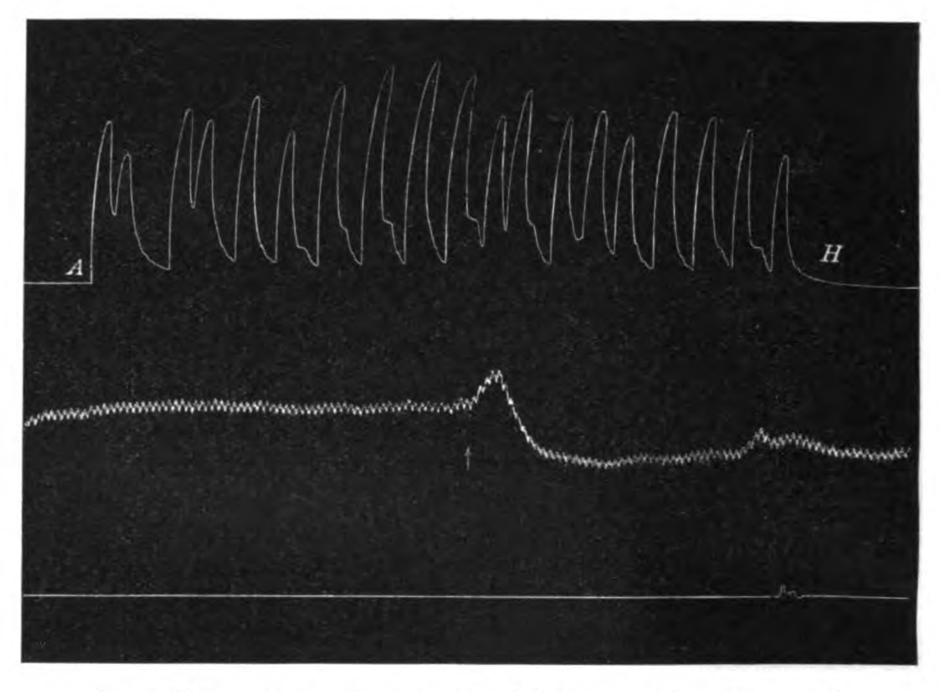


Fig. 6. Katze, 2900 g. Tier in tiefer Äthernarkose decerebriert nach Sherrington. Leichte Dyspnoe, die den Blutdruck kaum merklich beeinflußt. Künstliche Atmung mit feuchter Luft.

Obere Kurve: Ballon nach Starling in das Jejunum eingeführt. Registrierung mit Maaßschem Bellow-Recorder.

Untere Kurve: Blutdruck am Quecksilbermanometer. A. Einsetzen der Peristaltik nach 2 ccm Zülzerschem Hormonal, das 20 Min. zuvor eingespritzt worden war. Nach Injektion von 5 ccm Pankreasextrakt (V.-I. 200) bei ↑. Hemmung bei *H*.

Nachdem Ott und Scott[1]) behauptet haben, daß alle Organextrakte, mit Ausnahme der Milz, die Absonderung des Adrenalins vermehren, könnte man annehmen, daß die Wirkung des Pankreasextraktes auf den Darm gleichsam eine indirekte ist. Dafür spräche die andersartige Wirkung beim hungernden Tier, das Versagen nach mehrfacher Injektion und die lange Latenz. Dagegen spricht allerdings, daß, wenn man so viel Adrenalin injiziert als notwendig ist, um die Blutdrucksenkung

[2]) J. Ott and Scott, The action of glandular extracts upon the amount of epinephrin in the blood. Journ. Pharm. and experim. Therap. **13**, 625, 1912.

nach Pankreasextraktinjektion gerade aufzuheben, diese Adrenalinmenge noch nicht die durch Hormonal angeregte Peristaltik aufhebt.

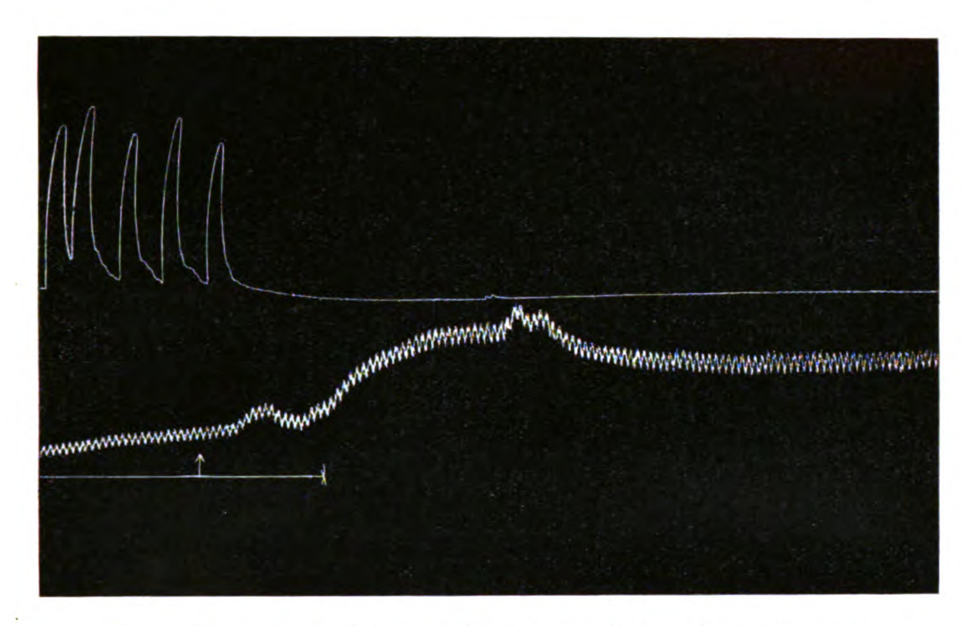


Fig. 7. Tier wie 6. Spätere Injektion von Hormonal, 35 Min. nach Abklingen der Wirkung von Pankreasextrakt. Einsetzen der Wirkung 40 Min. danach. Injektion von Adrenalin bei ↑ coupiert die Wirkung sofort.

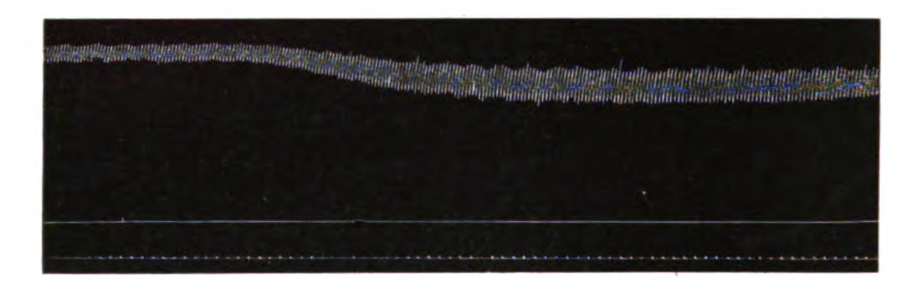
Wir haben schließlich das Fairchildsche Präparat durch fraktionierte Fällung mit Salzen in verschiedene Fraktionen weiter aufgeteilt und fanden stark tryptisch wirkende Fraktionen, die keinen Einfluß auf den Blutdruck mehr hatten (Fig. 8).

Andrerseits haben wir die Wirkung von Pankreaspreßsaft auf den Blutdruck geprüft und sahen sowohl bei aktivem wie inaktivem Saft (Preßsaft, ohne Zusatz von Darmschleimhaut hergestellt) Senkung des Blutdruckes; die Wirkung auf den Blutdruck hat also mit der verdauenden Wirkung eines Extraktes oder Saftes nichts zu tun, ein Resultat, das sich mit den Ergebnissen der Versuche von Balint und Molnar[1])

---

[1]) R. Balint und B. Molnar, Über den Einfluß des Pankreaspreßsaftes auf den Blutkreislauf. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. 2, Heft 2, 1912.

deckt, die während unserer Arbeit erschienen. (Sie haben nur inaktiven Preßsaft injiziert und fanden auch bei ihm Blutdrucksenkung.)



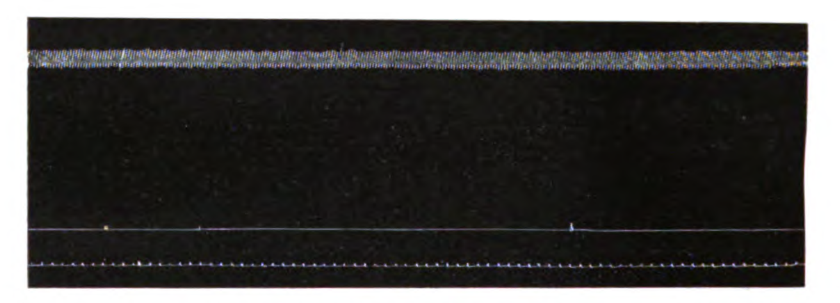


Fig. 8. Katze, 2200 g. Äther-Urethannarkose. Untere Kurve: Injektion einer Pankreas-Extraktfraktion von starker proteolytischer Wirkung ohne Einfluß auf den Blutdruck. Oben: Nachprüfung mit Originallösung, die auf gleiche proteolytische Stärke eingestellt war. Blutdruck Gad-Cowl

Fragt man sich nun, ob die Kreislaufwirkung oder die Wirkung auf die Darmmuskulatur die eigenartige Wirkung des Pankreasextraktes auf pathologisch veränderte Gewebe zu erklären vermag, so muß man gestehen, daß sich hier keine Brücke für das Verständnis schlagen läßt. Man könnte annehmen, daß die beim Kranken auftretenden Allgemeinerscheinungen auf im Prinzip ebenso wie beim Tier verlaufende Kreislaufänderungen zurückzuführen sind, da der Kranke ja oft labiler reagiert als der Gesunde. Aber warum gerade in den pathologisch veränderten Geweben, z. B. bei torpiden tuberkulösen Geschwüren, eine so lebhafte Hyperämie einsetzt, ist doch schwer verständlich. Soll man die Annahme machen, daß die Gefäße solcher Gebiete besonders fein auf vasomotorisch wirkende Substanzen

reagieren? Oder soll man sich der Ansicht von Jochmann und Müller anschließen, daß die Wirkung darauf beruht, daß die im tuberkulösen Eiter fehlenden Fermente durch injizierten Pankreasextrakt vermehrt oder vielleicht aktiviert werden[1]). Diese Ansicht entspräche etwa der Auffassung, die Caspari und Neuberg zu der Anwendung ihrer Metallverbindungen bei Carcinom hingeleitet haben. Im ersten Falle wäre das Primäre eine spezifische Vasomotorenwirkung, im zweiten eine spezifische Katalyse.

Typisch für den Stand der Frage nach dem Einfluß therapeutisch verwendeter Dosen von Fermenten ist, daß wir nicht einmal wissen, ob die per os zugeführten Pankreaspräparate direkt Anteil an der häufig beobachteten Besserung haben. Die Frage liegt ganz ebenso wie beim Pepsin. Seit den Untersuchungen von Minkowski und Abelmann weiß man, daß Zusatz von Pankreaspräparaten zu der Diät nach Pankreasexstirpation zum mindesten die Ausnutzung der Fette bessert. Daß dies aber kaum eine Fermentwirkung ist, beweist der Erfolg von Präparaten, die, wie das Pankreon, häufig so gut wie gar keine aktiven Fermente enthalten und doch bei Steatorrhöe die Fettstühle zum Verschwinden bringen und bei pankreaslosen Tieren die Ausnutzung der Fette erheblich bessern. In demselben Sinne spricht auch die von allen Klinikern, die sich damit befaßten, festgestellte Tatsache, daß nach einigen, oft schon nach einer subcutanen Injektion von Pankreasextrakt, z. B. der Trypsininjektion von Fairchild, der Appetit der Patienten rapide zunimmt. Tuberkulöse wie kachektische Krebskranke werden „fast gefräßig“, und das subjektive Befinden bessert sich zusehends. Oft hat man nach einigen Injektionen von Pankreasextrakt die Morphiumspritze ganz beiseite legen können. Vielleicht könnte man hier an eine Steigerung der Durchblutung, speziell im Darmgebiet, denken. Dabei hätte man wieder eine bei den Kranken gesteigerte Empfindlichkeit anzunehmen.

---

[1]) Bekanntlich wiesen Müller und Peiser nach, daß sich der heiße Eiter vom kalten, tuberkulösen durch einen reichlicheren Gehalt an proteolytischem Ferment unterscheidet. Sie, wie zuerst auch Baetzner, dachten auch wir, daß es bei der Einspritzung von Trypsin irgendwie zu den tuberkulösen Herden gelange und so die Durchblutung derselben anbahne.

Abgesehen von stürmischen lokalen Reaktionen, die sowohl bei krebsigen wie bei tuberkulösen Gebilden nach mehrfacher Injektion von tryptisch aktiven Pankreaspräparaten auftreten, sind sehr häufig ebenso stürmische Allgemeinerscheinungen nach der Art der schon beschriebenen bei Carcinomatösen und Tuberkulösen beobachtet worden. Diese werden nun, merkwürdig genug, durch Injektion von Pankreasdiastase aufgehoben. Sie schwinden häufig in 10 bis 20 Minuten. Es wurde in solchen Fällen Injectio Amylopsini Fairchild verwendet, die sehr große Mengen Amylopsin, und Trypsin nur in einer 100 V.-I. nicht überschreitenden Konzentration enthält. M. Cleaves[1]) meint, daß es sich hier um eine rein diuretische Wirkung handelt. Dieser Annahme widerspricht jedoch die Schnelligkeit der Wirkung, obgleich die Injektion wirklich sehr stark diuretisch wirkt. Eine direkte Wirkung des Trypsins auf die Nieren, auf die Cleaves hinweist, haben wir im Tierversuch nicht finden können. Bemerkt sei hier, daß Cleaves ihre Fälle nicht vorher auf Intaktheit der Nieren untersucht hat. Immerhin wäre es vielleicht in manchen Fällen mit großen Eiterungen oder Tumoren der Vorsicht halber geboten, Trypsin zusammen mit Amylopsin einzuspritzen, wofür Beard aus anderen Gründen plädiert.

Gänzlich jeder Deutung entzieht sich die von Major Lamballe mitgeteilte Tatsache, daß er durch zwei, höchstens drei Injektionen von Mischungen von Injectio Trypsini und Injectio Amylopsini ganz prompt Rezidive der Tertiana zu heilen imstande ist, und zwar so, daß kurze Zeit nach einer starken Temperaturerhöhung, die ja auch bei anderen Krankheiten die Reaktion andeutet, die Parasiten aus dem Blute schwinden.

Schluß.

Wie wir sehen, ist für das Verständnis der therapeutischen Wirkung von Pankreasextrakten der Weg erst angedeutet. Wir glauben kaum, daß man durch Versuche am gesunden Tiere allein viel weiter kommt. Enger als je hat sich hier die experimentelle Physiologie der experimentellen Pathologie und den klinischen Ergebnissen anzuschließen. Die nächsten und wichtigsten Fragen, die zu lösen wären, sind die nach

[1]) M. A. Cleaves, The physiological action of the pancreatic enzymes. Med. Record 1907. New-York, 1. Juni.

der besten Zuführungsart und Dosierung des Trypsins. Man wird die subcutane, intramuskuläre (die sich bei Malaria bewährt haben soll) und die intravenöse Beibringung strikt gegeneinander abwägen müssen.

Wir sind zufrieden, wenn es durch vorliegende Zeilen gelungen sein sollte, das Vorurteil über die Giftigkeit therapeutisch verwendbarer Mengen tryptisch aktiver Pankreasextrakte zu beseitigen und das Notwendigste zur Drogenkunde dieser Extrakte beigetragen zu haben.

Allgemeines über Wirkungen der Organextrakte:

Green, Ferments. London.

Duclaux, Traité de Microbiologie. Paris.

Oppenheimer, Fermente und ihre Wirkungen. Berlin 1913.

Wohlgemuth, Fermentmethoden. Berlin 1913.

H. Euler, Allgemeine Chemie der Enzyme. Wiesbaden 1910.

M. Abelmann, Ausnutzung der Nahrungsstoffe nach Pankreasexstirpation mit besonderer Berücksichtigung der Lehre von der Fettresorption. Dorpat 1890.

Albu, Beiträge zur Diagnostik der inneren und chirurgischen Pankreaserkrankungen. Sammlung zwangloser Abhandlungen von Albu. 1911.

A. Biedl, Innere Sekretion. 1914.

S. Rosenberg, Über experimentelle Diabetes. Med. Klin. 1912, Nr. 42, 43, 45.

Beiträge zu den chemischen Grundlagen der Benzolbehandlung der Leukämie.

Von

H. Boruttau und E. Stadelmann.

(Aus der ersten inneren und der physiologisch-chemischen Abteilung des städtischen Krankenhauses im Friedrichshain in Berlin.)

(Eingegangen am 28. Februar 1914.)

Die in den letzten Jahren nach dem Vorgange von Koranyi und Kiralyfi in der Budapester medizinischen Klinik an vielen Orten versuchte Behandlung der Leukämie mit Benzol hat sich zwar durchaus nicht als Mittel zur bleibenden Heilung dieser Krankheit, auch nicht als ganz ungefährlich erwiesen, scheint indessen, neben der Behandlung mit Röntgenstrahlen und in geeigneten Fällen mit dieser kombiniert, in der Tat längerdauernde Besserungen des Blutbefundes und Allgemeinbefindens in vielen Fällen erreichen zu lassen. Um so mehr beansprucht der Mechanismus dieser merkwürdigen therapeutischen Wirkung das wissenschaftliche Interesse. Fingerzeige in dieser Richtung gibt die toxikologische Literatur, die zufällige und gewerbliche Vergiftungen durch eingeatmete Benzoldämpfe beim Menschen und ad hoc angestellte Tierversuche betrifft. Eine Wirkung des Benzols auf die Formelemente des Blutes war schon vor den Versuchen von Selling in Amerika, die die Veranlassung zu der klinischen Anwendung in der v. Koranyischen Klinik gegeben haben, im Jahre 1903 durch Langlois und Desbouis in Paris[1]) konstatiert worden. Dieselben beobachteten eine Zunahme der Zahl der roten Blutkörperchen bei Tieren unter der Wirkung der Benzoldämpfe und waren geneigt, einen Einfluß der letzteren auf die

---

[1]) Journ. de Physiol. **9**, 258, 1907.

Blutbildungsstätten anzunehmen. In neuester Zeit hat eine zur Kritik der Benzoltherapie der Leukämie ausgeführte Untersuchung A. Pappenheim[1]) dazu veranlaßt, einerseits die Verminderung der Leukocyten als teilweise nur scheinbar und durch Retention in Organen vorgetäuscht zu erklären, andererseits hat er aber eine zerstörende Wirkung auf ihre Bildungsstätten, hauptsächlich das Knochenmark, in der Tat konstatiert, die aber nach ihm viel geringer sein soll, als die entsprechenden äußerst intensiven Zerstörungen durch die von radioaktivem Thorium ausgesandten Strahlen.

Weiterhin muß der Arbeiten von Santesson[2]) Erwähnung getan werden, der als Grundlage der Giftwirkungen des Benzols aus seinen Tierversuchen eine Mobilisation des Fettes im Körper erschließt, ähnlich wie sie bei der Phosphorvergiftung stattfindet.

Santesson glaubt dabei einen Faktor ausschließen zu dürfen, dessen Mitwirkung nach den älteren physiologisch-chemischen Untersuchungen über das Schicksal des Benzols und seiner Derivate im Tierkörper doch immerhin nahe genug zu liegen scheint und auch nach der nunmehr nachgewiesenen anatomischen Veränderung der Blutbildungsstätten durch das Benzol doch jedenfalls mit in Betracht gezogen werden muß, wenn es die chemischen Grundlagen der hier in Betracht kommenden Vorgänge aufzuhellen gilt. Es ist dies die Oxydation des Benzols im Organismus zu Phenolen, die zuerst von Schultzen und Naunyn[3]) im Jahre 1867 entdeckt, dann von I. Munk[4]) bestätigt, von Baumann und Herter[5]) sowie Nencki und Giacosa[6]) näher erforscht worden ist. Wir wissen aus diesen Arbeiten sowie denjenigen Schmiedebergs[7]), daß eingegebenes Benzol beim Kaninchen, Hund und Menschen im Harn zum Teil als Phenol, zum Teil auch als Brenzkatechin und Hydrochinon wieder erscheint, in einer

[1]) Wiener klin. Wochenschr. **1913**.

[2]) Arch. f. Hygiene **31**, 236, 1889; Skand. Arch. f. Physiol. **10**, 1, 1890.

[3]) Arch. f. Anat. u. Physiol. **1867**, 340.

[4]) Arch. f. d. ges. Physiol. **12**, 142, 1876.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **1**, 224, 1877.

[6]) Ebenda **4**, 325, 1880.

[7]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **14**, 288, 1881.

Menge, die nur einem Teile des verabreichten Benzols entspricht, und daß diese Stoffe nicht frei, sondern als Ätherschwefelsäuren und gepaarte Glucuronsäuren im Harn enthalten sind.

Nach Benzolfütterung kann deshalb, wie aus der angeführten Literatur ersichtlich ist, das nach Baumann berechnete Verhältnis der ausgeschiedenen freien Schwefelsäure zur gepaarten Schwefelsäure im Harn A : B, das beim Hunde sowie beim Menschen bei gemischter Kost normalerweise etwa 13 : 1 bis 10 : 1 beträgt, sich stark verändern, so daß es gleich 1 wird oder sich umkehrt, indem die gepaarte Schwefelsäure die freie um ein Vielfaches übertrifft. Diese Veränderung tritt sehr bald ein und überdauert eine größere Benzolgabe genau wie bei direkter Einverleibung von Phenol oder Dioxybenzolen usw. um mehrere Tage. Das Benzol wird dabei ziemlich allmählich ausgeschieden; Nencki und Giacosa fanden, daß nach einer einmaligen Gabe von 2,5 g bei einem Hunde das Phenol erst am 6. Tage aus dem Harn verschwunden war und bis dahin in Summa 0,0889 g ausgeschieden waren, also nur etwa der 30. Teil des gereichten Benzols. Schmiedeberg fand von binnen 2 Tagen einem Hunde einverleibten 21 g Benzol in dieser Zeit 1,884 g in Form von Phenol und 0,445 g in Form von Dioxybenzolen im Harn wieder, also 8,5 $^0/_0$. Daß die Art der Ernährung wenigstens auf die Art der Bindung der Phenole einen Einfluß hat, geht daraus hervor, daß bei den erstgenannten Autoren gelegentlich die Menge der gepaarten Schwefelsäure die entsprechende Menge wiedergefundenen Phenols stark übertrifft, daß dagegen Schmiedeberg durch mehrtägige N-freie Fütterung die zur Verfügung stehende Schwefelsäure so herabsetzen konnte, daß ein sehr großer Teil des ausgeschiedenen Phenols nicht an Schwefelsäure, sondern an Glucuronsäure gebunden im Harn erschien.

Daß individuelle Unterschiede und Einflüsse der Ernährung außer den Paarungsverhältnissen auch die Intensität der Oxydation einverleibten Benzols beeinflussen können, erscheint von vornherein recht wahrscheinlich. So hat denn Juschtschenko[1]) die Menge des bei 1 g täglicher Benzolgabe im Harn

[1]) Arch. f. Psychiat. **45**, 153, 1909.

erscheinenden Phenols geradezu als Maß der Intensität der Oxydationsprozesse bei Geisteskranken bestimmt und vielfach gegen die Norm herabgesetzt gefunden. Daß auch die Menge der im Harn erscheinenden höheren Oxydationsstufen des Benzols einen Rückschluß auf die Intensität von Oxydationsprozessen im Körper gestattet, dürfte nicht von der Hand zu weisen sein. Einen Anhalt für sie bietet die Dunkelfärbung des Harns, die durch Farbstoffe der Chinonreihe bedingt wird und deren Auftreten bei der Eingabe von Phenolen allgemein bekannt ist. Von demjenigen Teile des aufgenommenen Benzols, der der Oxydation zu Phenolen usw. nicht anheimfällt, mag ein Anteil wohl in Dampfform durch die Lungen ausgeschieden werden (Benech u. a.); andererseits fand M. Jaffé[1]) im Harn benzolgefütterter Kaninchen Muconsäure, wenn auch in relativ geringen Mengen, so daß die Sprengung des Benzolrings, Überführung in aliphatische Verbindungen und ev. Oxydation dieser letzteren gleichfalls im Bereich der möglichen Schicksale des Benzols im Stoffwechsel liegt.

Wir haben Gelegenheit genommen, den Harn zweier Leukämiker, die längere Zeit, teilweise mit den notwendig erscheinenden Unterbrechungen, sowie auch kombiniert mit der Röntgenbestrahlung, der Benzoltherapie unterworfen wurden, fortlaufend zu untersuchen. Ein Vergleich bot sich an Kranken, bei denen die Untersuchung den Verdacht auf Leukämie nicht bestätigte und die gleichfalls eine Zeitlang Benzol erhielten, sowie ein etwas länger dauernder Versuch am Hunde. Auf Einhaltung einer gleichförmigen, täglich genau kontrollierten Ernährung konnte bei der langen Dauer nicht bestanden werden, so daß etwaige größere Schwankungen der Gesamtschwefelsäureausscheidung bei demselben Individuum zum Teil auf Kosten der Ernährung zu setzen sind. Möglichst fortlaufend bestimmt wurde die freie und die gepaarte Schwefelsäure im Harn nach Baumann, die Menge der flüchtigen Phenole nach Kossler und Penny. Ferner wurde etwaiges Dunkelwerden des Harns sorgfältig beachtet und die Intensität notiert. Weiter wurde zur Schätzung der ausgeschiedenen Glucuronsäure die zweite Tollenssche Probe mit Naphthoresorcin und Salzsäure sowie

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 58, 1909.

Ausschütteln mit Äther angestellt. Endlich ist bei den Leukämikern, bei denen fortlaufende mikroskopische Blutuntersuchungen über die Abnahme der Leukocyten Aufschluß gaben, auch die Ausscheidung des gesamten Purinstickstoffs durch Schätzung mit dem Hallschen Purinometer fortlaufend kontrolliert worden, um etwaiges Zusammenfallen vermehrter oder verminderter Purinausscheidung mit Verstärkung der Oxydationsprozesse nicht zu übersehen, aus dem sich ein Zusammenhang dieser letzteren mit vermehrtem Zerfall von Leukocyten resp. Zerstörung ihrer Bildungsstätten hätte erschließen lassen.

In den beistehenden Tabellen ist das Zahlenmaterial z. T. etappenweise, unter Weglassung von Zwischenperioden, in denen keine wesentlichen Veränderungen stattgefunden haben oder aus äußeren Gründen Bestimmungen wegfallen mußten, so zusammengestellt, daß gewisse Ergebnisse leicht in die Augen fallen.

In 4 Tagen des Beginns der Benzoldarreichung bei dem Leukämiker E. (Tabelle I), in denen dieser zusammen 8,5 g Benzol erhielt, wurden zusammen 2,286 g flüchtige Phenole ausgeschieden, also etwa 27 % des gereichten Benzols, während das Verhältnis A/B sich prompt umkehrte von 6 : 1 auf im Mittel 1 : 9. Auch in einer 14 Tage später beginnenden längeren Berechnungsperiode, in der im ganzen 80 g Benzol genommen wurden, wurden nur 13,685 g, also weniger als $^1/_5$, in Form flüchtiger Phenole ausgeschieden. Auffällig sind dabei die oft recht bedeutenden Schwankungen der täglichen Ausscheidung, die nicht immer mit ähnlichen Schwankungen des Koeffizienten A/B parallel gehen. Es hat manchmal den Anschein, daß an Tagen mit besonders hoher Phenolausscheidung eine bei diesem Patienten ziemlich früh sich einstellende Tendenz zum Dunkelwerden vorhanden ist, die auf der Bildung der höheren Phenole beruht; indessen zeigt der weitere Verlauf, daß auch phenolreicher Harn hell sein und beim Stehen an der Luft so bleiben kann, umgekehrt an flüchtigen Phenolen relativ armer Harn stark nachdunkeln oder schon dunkel gelassen werden kann; in letzterem Falle muß also angenommen werden, daß bereits bei relativ geringer Ansammlung von Benzol dasselbe bis zu den höheren Oxydationsstufen oxydiert ausgeschieden wird.

Tabelle I.

Pat. E. (Leukämie).

Datum	Benzol g	Freie H_2SO_4	Gep. H_2SO_4	A/B	Purin-N als $\overline{U}$	Flücht. Phenole g	Bemerkungen
12. II.	—	—	—	—	—	—	
13.	2	0,88	0,15	6 : 1	3,123	0,054	1350000 Erythr.,
14.	2	0,10	0,88	1 : 9	2,457	0,337	860000 L. 25 % Hb.
15.	2	0,08	1,00	1 : 12	1,216	1,216	Glucuronsäure
17.	2,5	0,16	0,96	1 : 6	0,679	0,679	schwach positiv.
	Sa. 8,5					2,286	
25. II.	3,5	0,03	0,79	1 : 26	1,507	0,385	
26.	4	0,07	0,84	1 : 13	1,529	0,285	1500000 Erythr.,
27.	4	0,41	1,35	1 : 33	2,402	0,334	1000000 Leuk.
28.	4	0,14	1,34	1 : 10	2,066	0,090	
1. III.	4	0,08	0,83	1 : 10	1,205	0,596	
3.	4	0,11	0,87	1 : 8	1,512	1,361	Urin dunkel, Glu-
4.	4	0,15	1,39	1 : 9	2,671	1,584	curonsäure positiv.
5.	4	0,46	0,83	1 : 2	2,883	1,177	1600000 Erythr.
6.	4	0,24	1,71	1 : 7	3,212	0,775	970000 Leukocyt.
7.	4	0,52	1,42	1 : 3	3,800	0,703	Urin dunkel.
8.	4	0,19	1,07	1 : 6	—	0,397	
9.	4	0,25	1,75	1 : 7	3,671	1,359	
10.	4	0,56	1,76	1 : 1	2,730	0,114	Urin dunkel, Glu-
11.	4	0,14	1,76	1 : 5	3,212	0,216	curonsäure positiv.
12.	4	0,77	2,01	1 : 3	2,623	0,207	1600000 Erythr.,
13.	4	0,03	2,27	1 : 88	2,722	0,376	900000 Leuk.
14.	4	0,72	1,31	1 : 14	2,741	0,454	Urin hell, schwach
15.	4	1,74	2,05	1 : 1	2,066	0,776	nachdunkelnd.
17.	4	1,30	2,65	1 : 4	2,014	0,434	
18.	4	0,90	1,83	1 : 2	2,079	2,035	
	Sa. 80					13,685	
22. III.	4	0,26	2,07	1 : 8	1,740	3,802	1600000 Erythr.,
23.	4	0,18	2,52	1 : 14	—	3,248	750000 Leukocyt.
25.	4	0,37	2,78	1 : 8	1,474	3,533	
26.	4	0,96	2,41	1 : 3	1,709	2,666	2100000 Erythr.,
28.	4	0,43	2,06	1 : 5	1,321	2,485	780500 Leukocyt.
29.	4	0,46	3,01	1 : 7	2,014	2,751	
30.	4	0,84	2,21	1 : 3	—	1,936	
31.	4	—	1,92	—	1,321	1,439	
1. IV.	4	1,00	1,36	1 : 14	0,735	0,900	Harn dunkel, Glu-
2.	4	0,12	1,44	1 : 12	0,655	0,921	curonsäure positiv.
	Sa. 40					23,681	
						am 3. IV.:	2400000 Erythr.,
							354000 Leukocyt.
23. V.	3	0,17	0,77	1 : 4,5	0,699	0,945	3800000 Erythr.,
24.	3	0,70	0,60	1 : 1	0,882	0,851	190000 L. 50 % Hb.
26.	3	0,31	0,86	1 : 3	0,861	0,937	
27.	3	0,66	0,96	1 : 1,5	1,033	1,124	Harn dunkelt an
28.	3	0,74	0,99	1 : 1	0,983	1,732	der Luft nach.
29.	3	0,71	1,12	1 : 2	1,119	1,876	
30.	3	0,63	1,11	1 : 2	1,081	1,268	Glucuronsäure
31.	3	0,99	1,02	1 : 1	0,947	1,268	meist positiv.
	Sa. 24					9,401	

Tabelle I (Fortsetzung).

Datum	Benzol g	Freie H_2SO_4	Gep. H_2SO_4	A/B	Purin-N als $\overline{U}$	Flücht. Phenole g	Bemerkungen
1. VI.	3	1,54	0,98	1,5 : 1	—	0,965	Harn dunkel.
2.	3	1,19	0,88	1,5 : 1	1,007	0,965	Hell.
3.	2	0,60	1,37	1 : 2	1,089	1,132	Dunkel.
4.	2	0,71	1,01	1 : 1,5	0,777	0,943	Hell.
5.	2	0,22	1,38	1 : 6	—	1,332	} Dunkel.
6.	2	0,11	1,13	1 : 10	0,861	1,903	
	Sa. 14					7,240	
						am 5. VI.:	3750000 Erythr., 272000 L. 50 % Hb.
13. VI.	2	1,10	1,38	1 : 1	—	1,368	4935000 Erythr.,
14.	2	—	—	—	—	1,368	419500 Leukocyt.
15.	2	—	—	—	—	1,295	
16.	2	—	—	—	—	1,036	
17.	2	1,09	0,99	1 : 1	—	1,535	
18.	2	0,64	1,00	1 : 1,5	1,081	1,477	3300000 Erythr.,
19.	2	0,51	0,97	1 : 2	0,786	1,710	330000 Leukocyt.
20.	2	0,87	1,21	1 : 1	1,040	1,899	
21.	2	1,03	0,52	2 : 1	0,851	2,255	Glucuronsäure po-
23.	2	0,13	1,06	1 : 8	0,733	1,544	sitiv.
26.	2	0,69	0,43	1,5 : 1	0,492	1,196	Harn dunkel oder
27.	2	0,01	1,11	1 : 100	0,732	1,720	dunkelt nach.
28.	2	0,42	0,35	1 : 1	0,473	0,667	
30.	2	0,04	1,67	1 : 40	0,885	1,576	
1. VII.	2	0,002	0,82	1 : 400	0,662	1,063	
2.	2	0,02	0,95	1 : 60	0,764	1,129	
3.	2	0,12	1,06	1 : 9	0,680	1,279	
4.	2	0,00	0,73	1 : ∞	0,567	1,605	2600000 Erythr.,
5.	2	0,07	1,20	1 : 17	0,756	1,586	421000 Leukocyt.
7.	2	0,28	1,17	1 : 4,5	0,907	1,076	
8.	2	0,59	0,83	1 : 1,5	0,983	1,652	
9.	2	0,09	1,00	1 : 11	0,655	0,914	
10.	2	0,37	0,63	1 : 2	0,688	0,794	
11.	2	0,09	1,82	1 : 21	1,255	0,513	
12.	2	0,09	1,93	1 : 21,5	1,229	2,578	
14.	2	0,40	1,01	1 : 2,5	0,874	0,896	
15.	2	0,36	1,25	1 : 3,5	0,983	1,534	2150000 Erythr.,
17.	0	0,70	0,98	1 : 1,5	0,941	0,792	530000 Leukocyt.
19.	0	0,71	1,07	1 : 1,5	0,737	0,064	
21.	0	1,30	0,10	12 : 1	0,735	Spur	3390000 Erythr.,
23.	0	1,04	0,06	15 : 1	0,492	Spur	580000 Leukocyt.
	Sa. 54					38,121	

Im allgemeinen ist bei solchen dunklen Harnen Glucuronsäure besonders regelmäßig nachweisbar und es fällt die Reaktion für sie kräftig aus; während die Erwartung, daß letzteres an Tagen, an denen die gesamte Schwefelsäure (freie plus gepaarte) niedrige Werte zeigt, also Mangel an disponibler Schwefelsäure zur Paarung herrschte, — wo dann auch B ein hohes Viel-

faches von A bildet (z. B. am 25. bis 26. II. und 13. III. im vorliegenden Falle), — besonders zuträfe, daß also immer Glucuronsäure für fehlende Schwefelsäure einspringt, sich nicht bestätigt.

Während nun bei E. in den bis jetzt betrachteten ersten 5 Wochen der Benzolbehandlung eine wesentliche Veränderung des äußerst ungünstigen Blutbildes und ein Rückgang der Milzvergrößerung nicht zu beobachten war, erfolgt dies prompt im Verlaufe der nächsten Perioden, in denen ein weit höherer Prozentsatz des genommenen Benzols als Phenol im Harn erscheint: von 40 g in der Zeit zwischen dem 22. III. und 2. IV. nicht weniger als 23,681 g, also über die Hälfte; ja an den 3 ersten Tagen dieser Periode waren 3,2 bis 3,8 g Phenol, also fast der ganzen Tagesdosis Benzol entsprechend, im Harn ausgeschieden worden. Gleichzeitig ging die Leukocytenzahl von 750000 am 22. III. auf 354000 am 3. IV. zurück und die der Erythrocyten stieg von 1600000 auf 2400000. Diese Besserung machte weitere Fortschritte, wenigstens bezüglich der Erythrocytenzunahme, während bei Herabsetzung der Benzoldosis in den folgenden Perioden (aus Gründen der Vorsicht, veranlaßt durch inzwischen erschienene Mitteilungen über schädliche Folgen der Benzoltherapie) die ausgeschiedene Menge Phenol immer noch etwa die Hälfte bis ein Drittel der gereichten Benzolmenge betrug. Ja in der letzten 40tägigen Periode vom 13. VI. bis zum 23. VII., eine Woche nach Aussetzen des Benzols, sind von den gereichten 54 g nicht weniger als 38 g im Harn als Phenol wieder erschienen! Daß dabei keine Speicherung im Organismus stattgefunden hat, ist daraus zu ersehen, daß bereits am 4. Tage nach der letzten Benzoldosis das Phenol aus dem Harn so gut wie verschwunden ist. Trotzdem ist inzwischen die Leukocytenzahl langsam bis auf 580000 wieder angestiegen, und die Erythrocytenzahl, die ein Maximum erreicht hatte und zeitweise der Normalzahl von nahe 5 Mill. gleich kam, sinkt und schwankt zwischen $2^1/_7$ und $3^1/_8$ Mill.

Der Patient ist inzwischen neben der Benzolmedikation auch mit Röntgenstrahlen behandelt worden, und dies wird noch bis Anfang August fortgesetzt, um welche Zeit ein neuerlicher sehr starker Abfall der Leukocytenzahl konstatiert wird

P. wurde dann auf Wunsch gebessert entlassen. Die Purinausscheidung ist inzwischen allmählich immer zurückgegangen.

Tabelle II.

Pat. K. (Leukämie).

Datum	Benzol g	Freie H_2SO_4	Gep. H_2SO_4	A/B	Flüchtige Phenole g	Bemerkungen
17. I.	—	—	—	—	—	3 900 000 Erythrocyt.,
18.	0	3,18	0,70	4,5 : 1	0,40	806 000 Leukocyten,
19.	3,5	0,31	2,53	1 : 8	0,83	70 % Hb.
20.	3,5	0,01	3,08	1 : 296	1,55	
21.	4	0,27	1,80	1 : 7	2,44	
22.	4	0,46	3,64	1 : 8	2,49	
23.	4,5	0,06	2,24	1 : 36	1,90	
24.	4,5	0,71	2,89	1 : 4	2,33	
25.	5	0,41	1,04	1 : 2,5	0,33	
26.	5	0,42	2,32	1 : 5,5	0,49	Glucuronsäure positiv, Harn dunkelt nach.
27.	5	0,74	3,18	1 : 4	1,57	
28.	5	0,81	1,58	1 : 2	0,55	
29.	5	0,02	3,25	1 : 200	1,21	
	Sa. 54				16,09	
5. II.	4	0,22	1,92	1 : 9	1,155	Harn hell, Glucuronsäure positiv.
6.	4	1,38	3,83	2,5 : 1	2,497	
7.	4	0,75	2,01	2,5 : 1	1,405	
8.	2	0,38	2,15	1 : 6	0,772	
9.	2	2,35	1,90	1 : 1	0,652	Glucuronsäure negat.
10.	2	1,30	0,94	1,5 : 1	0,381	
	Sa. 18				6,862	
20. II.	3	1,79	1,28	1,5 : 1	0,782	
25.	3	0,50	2,28	1,5 : 1	0,184	4 800 000 Er., 40 000
1. III.	3	2,80	1,74	1 : 1,5	1,023	Leukoc., 70 % Hb.
5.	3	0,94	1,01	1 : 1	1,123	
10.	3	0,55	1,81	1 : 3	1,017	5 000 000 Er., 41 000
	Sa. 15				4,129	Leukoc., 70 % Hb.
14. III.	4	2,09	1,46	1,4 : 1	2,000	
20.	4	0,49	2,40	1 : 5	1,548	
25.	4	0,08	1,60	1 : 55	2,348	5 000 000 Er., 20 000
31.	4	2,53	2,44	1 : 1	1,315	Leukoc., 82 % Hb.
5. IV.	0	1,97	2,23	1 : 1,2	Spur	
10.	0	3,07	0,44	7 : 1	0	
	Sa. 16				7,211	

In der Tabelle II ist etappenweise das Verhalten der in Rede stehenden Vorgänge dargestellt bei dem Leukämiker K., bei dem eine Benzolbehandlung von längerer Dauer schon stattgefunden hatte, bevor wir mit dieser Untersuchung be-

gannen, inzwischen aber ausgesetzt worden war. Die Schwankungen der Ausscheidung und des Quotienten A/B, des Dunkelwerdens und des Erscheinens von Glucuronsäure im Harn sind ganz analog den im vorhergehenden Falle betrachteten. Die Menge der ausgeschiedenen flüchtigen Phenole beträgt etwa erst $^1/_4$, dann $^1/_3$, zuletzt nahezu die Hälfte der an den betreffenden Tagen im Mittel gereichten Benzolmenge (in den letzten beiden Perioden wurde der Harn etwa jeden 5. Tag als Stichprobe analysiert, ohne daß unseres Erachtens die prinzipielle Richtigkeit der Ergebnisse gelitten hat). Auch hier ist parallel mit der Zunahme der Oxydierung des Benzols im Körper die Leukocytenzahl herabgegangen, zunächst von 806 000 bis auf etwa 40 000, nachher, als auch hier die Röntgenbestrahlung mit der Benzolbehandlung kombiniert wurde, bis auf 20 000, während die Erythrocytenzahl von 3 000 000 auf 5 000 000 stieg. Auch hier Entlassung in gebessertem Zustande.

Tabelle III.

Pat. G., Pseudoleukämie.

Datum	Benzol g	Freie H_2SO_4	Gep. H_2SO_4	A/B	Purin-N als $\overline{U}$	Flücht. Phenole g	Bemerkungen
7. VI.	3	1,50	0,20	8 : 1	—	0,260	4 100 000 Erythrocyt.,
8.	3	0,48	0,28	1,5 : 1	—	0,137	4400 Leukocyten,
9.	3	1,22	0,79	1,5 : 1	0,983	0,576	64 % Hb.
10.	3	—	2,31	—	—	0,514	
11.	3	0,08	2,33	1 : 30	1,599	0,447	
12.	3	2,25	0,64	3,5 : 1	1,572	0,718	
13.	3	1,38	0,62	1 : 1	—	0,799	
14.	3	1,88	0,68	3 : 1	1,599	0,565	
15.	3	—	—	—	—	0,550	
16.	3	—	—	—	—	0,319	
17.	3	1,77	0,40	4,5 : 1	1,142	0,551	Harn dunkelt etwas
18.	3	1,43	0,83	1,8 : 1	—	0,140	nach.
19.	3	2,08	0,61	3,5 : 1	0,882	0,677	
20.	3	1,24	0,70	2 : 1	0,901	0,237	Harn etwas dunkel.
21.	3	1,05	0,57	2 : 1	0,861	1,198	
22.	3	0,35	0,31	1 : 1	—	0,627	
23.	3	0,93	0,17	5,5 : 1	0,590	0,625	
24.	3	2,08	0,11	19 : 1	0,945	0,525	Harn etwas dunkel.
25.	3	1,10	0,21	5,5 : 1	0,544	1,676	
26.	3	1,42	0,56	2,5 : 1	0,819	1,901	
	Sa. 60					13,042	
Vom 21. bis 26. VI.	Sa. 18					6,562	

Tabelle IV.

Pat. N., Milzschwellung.

Datum	Benzol g	Freie H_2SO_4	Gep. H_2SO_4	A/B	Purin-N als $\overline{U}$	Flücht. Phenole g	Bemerkungen
23. V.	0	1,66	0,03	8 : 1	—	0,068	
24.	0	1,43	0,17	12 : 1	—	0,051	
25.	0	1,40	0,16	8 : 1	—	0,013	
26.	1	1,72	0,25	7 : 1	0,91	0,082	
27.	2	1,63	0,54	3 : 1	1,12	0,495	
28.	2,5	1,83	0,38	5 : 1	0,93	0,892	
29.	2,5	1,10	0,53	2 : 1	0,91	0,897	
30.	2,5	0,89	0,77	1 : 1	0,87	0,421	
31.	3	0,73	0,53	1,5 : 1	0,54	0,766	
1. VI.	4	0,96	0,59	1,5 : 1	—	0,553	
2.	4	1,03	0,65	1,5 : 1	0,68	0,637	
3.	4	1,02	0,59	2 : 1	0,64	0,508	Harn dunkel.
4.	4	0,82	0,73	1 : 1	0,50	0,451	
5.	4	0,95	0,40	2,5 : 1	0,22	0,491	
6.	2	0,56	0,57	1 : 1	—	0,590	Harn dunkel gefärbt. (6.–10.)
7.	2	1,00	0,35	3 : 1	0,43	0,721	
8.	0	0,99	0,30	3,5 : 1	0,50	0,337	
9.	0	0,94	0,28	3,5 : 1	0,73	0,371	
10.	0	0,77	0,27	3 : 1	0,57	0,112	
11.	0	0,75	0,42	2 : 1	0,64	0,119	
12.	0	0,55	0,29	2 : 1	—	0,090	
13.	0	0,83	0,33	2,5 : 1	0,81	0,096	
	Sa. 37,5					8,635	

Wir stellen diesen Fällen auf den Tabellen III bis VI das Verhalten gegenüber von zwei Patienten, bei denen anfangs Verdacht auf Leukämie bestand, aber durch das Blutbild nicht bestätigt wurde, sowie zwei blut- und milzgesunden Rekonvaleszenten, bei denen wir eigens zum Zwecke des Vergleiches ohne jede üble Wirkung ähnliche Benzoldosen wie bei den Leukämikern gereicht haben. Die Ausscheidung erfolgte prinzipiell ähnlich wie bei diesen; die Schwankungen sind oft ebenso auffällig; indessen erreicht das Verhältnis des im Harn ausgeschiedenen Phenols zum gereichten Benzol nirgends die Höhe wie dort, auch haben wir eine viel geringere Tendenz des Harns zum Dunkelwerden, also zur Bildung der höheren Phenole beobachtet. Jenes Verhältnis beträgt im Durchschnitt $^1/_4$, steigt bei G. (Tabelle III) in den letzten Tagen auf etwas über $^1/_3$. Freilich sind die Versuche nicht ganz so lange fortgesetzt wie die therapeutischen bei den Leukämikern. Aber es ist in den Kontrollversuchen überall auffällig, daß

Tabelle V.

Rekonvaleszent L.

Datum	Benzol g	Freie H_2SO_4	Gep. H_2SO_4	A/B	Flüchtige Phenole g	Bemerkungen
22. IX.	4	0,65	0,69	1 : 1	0,322	
23.	4	0,37	1,50	1 : 4	0,959	
24.	4	0,11	1,30	1 : 12	0,838	
25.	4	0,27	1,62	1 : 6	1,340	
26.	4	0,75	1,74	1 : 2,5	1,347	
28.	4	0,23	3,18	1 : 14	1,722	
29.	4	0,63	1,21	1 : 2	0,959	
30.	4	0,65	1,16	1 : 2	0,810	
1. X.	4	0,62	1,50	1 : 2,5	0,878	
2.	4	0,59	1,26	1 : 2	0,600	
3.	4	0,14	1,46	1 : 10	1,206	
5.	4	0,19	1,85	1 : 10	1,206	
6.	4	0,27	1,63	1 : 60	0,600	
7.	4	0,05	1,31	1 : 25	0,993	
8.	4	0,35	1,87	1 : 5,5	1,233	
9.	4	0,49	1,51	1 : 3	1,477	
10.	4	0,64	1,65	1 : 2,5	0,515	
12.	4	0,48	1,66	1 : 3,5	1,378	Harn beginnt zu dunkeln.
13.	4	0,09	1,86	1 : 20	1,571	
14.	4	0,63	1,58	1 : 2,5	1,127	
15.	4	0,95	1,49	1 : 2	0,251	
16.	4	0,63	1,88	1 : 3	0,427	
17.	4	0,79	1,91	1 : 2,5	1,638	
19.	4	0,80	1,44	1 : 2	1,474	
20.	0	0,37	1,72	1 : 5	1,303	
	Sa. 96				25,185	

auch die Tendenz zur Umkehr des Quotienten A/B viel geringer ist — besonders auffällig bei B. (Tabelle VI), in welchem Falle die Harnphenole nicht täglich fortlaufend bestimmt worden sind. Wenn man also mit Schmiedeberg[1]) geneigt ist, die Oxydation und Paarung der aromatischen Körper im Organismus als eng miteinander verknüpfte Vorgänge anzusehen, so wird auch aus der prompteren Umkehr von A/B beim Leukämiker auf eine intensivere Oxydation solcher Stoffe geschlossen werden können.

Wir haben schließlich auch noch einen Benzolfütterungsversuch am Hunde, allerdings von etwas kürzerer Dauer, angestellt. Die Schwankungen der ausgeschiedenen Phenolmengen und des Quotienten A/B, sowie das Auftreten der Glucuron-

---

[1]) a. a. O,

Tabelle VI.
Rekonvaleszent B.

Datum	Benzol g	Freie H_2SO_4	Gep. H_2SO_4	A/B	Flücht. Phenole g	Bemerkungen
22. IX.	4	1,22	0,27	4 : 1	—	
23.	4	0,48	0,69	1 : 1,5	0,402	
24.	4	0,30	1,50	1 : 5	—	
25.	4	0,67	0,78	1 : 1	0,080	
26.	4	0,66	0,84	1 : 1	—	
27.	4	1,02	1,69	1 : 1,5	0,994	
29.	4	0,38	0,87	1 : 2	0,514	
30.	4	0,50	0,89	1 : 2	—	
1. X.	4	0,56	0,90	1 : 2	0,476	
2.	4	0,59	0,80	1 : 1,5	0,488	
3.	4	0,48	0,74	1 : 1,5	—	
4.	4	0,96	1,45	1 : 1,5	0,546	
6.	4	1,03	1,30	1 ; 1,5	—	
7.	4	0,54	0,63	1 : 1	0,301	
8.	4	0,74	0,78	1 : 1	—	
9.	4	0,82	0,78	1 : 1	0,229	
10.	4	0,77	0,61	1,5 : 1	1,923	
11.	4	1,12	0,89	1 : 1	0,193	
13.	4	0,29	0,65	1 : 2	—	
14.	4	0,66	0,59	1 : 1	—	
15.	4	0,59	0,19	3 : 1	—	
16.	4	0,22	0,50	1 : 2	—	
17.	4	0,21	0,74	1 : 3,5	0,443	Harn dunkelt nach, positive Glucuronsäureprobe.
18.	4	0,54	0,34	1,5 : 1	0,112	
20.	4	0,39	0,47	1 : 1	0,075	
21.	3	0,86	0,23	4 : 1	—	
22.	3	0,74	0,16	5 : 1	0,308	
23.	1	1,03	0,23	6 : 1	—	
24.	0	1,00	0,16	6 : 1	0,139	
25.	0	1,13	0,19	6 : 1	0,043	
26.	0	1,65	0,23	7 : 1	—	
27.	0	1,35	0,34	4 : 1	0,087	
28.	0	1,53	0,32	4 : 1	—	

säure sind auch hier angedeutet. Zum Dunkelwerden des Harns ist es überhaupt nicht gekommen. Die gesamte ausgeschiedene Phenolmenge beträgt nur 8,9 % des gegebenen Benzols, woraus sich in Bestätigung der früher erwähnten älteren Arbeiten ergibt, daß der menschliche Organismus, wenigstens den therapeutisch in Betracht kommenden Dosen gegenüber, ein stärkeres Oxydationsvermögen für Benzol besitzt.

Daß diese Oxydationsvorgänge mit den Zerstörungsvorgängen in den lymphatischen Organen, auf denen die Abnahme der Leukocytose beruht, irgendeinen Zusammenhang haben dürfen, erscheint

Tabelle VII.
Hund von 7 kg.

Datum	Benzol g	Harnmenge ccm	Freie H_2SO_4	Gep. H_2SO_4	A/B	Flücht. Phenole g	Glucuronsäure
27. X.	0	0					
28.	2	0					
29.	2	0					
30.	2	570	0,25	0,62	1 : 2,5	0,2069	positiv
31.	2	0	—	—	—	—	—
1. XI.	2	350	0,39	0,64	1 : 1,5	0,3475	positiv
2.	2	1400	0,41	0,72	1 : 1,5	0,1561	negativ
3.	1	725	0,19	0,28	1 : 2,5	0,2519	"
4.	1	950	0,61	0,30	2 : 1	0,0825	positiv
5.	0	265	0,05	0,25	1 : 4,5	0,0670	"
6.	1	910	1,85	0,20	9,5 : 1	0,0395	"
8.	0	1050	1,37	0,28	5 : 1	0,1500	negativ
9.	0	680	0,71	0,05	14 : 1	0,0250	"
	Sa. 15 g					Sa. 1,3354 g	

durchaus möglich, nach dem von uns konstatierten Parallelismus sogar wahrscheinlich. Daß die Lipoidlöslichkeit des Benzols bei seiner therapeutischen Wirkung eine Rolle spielt, ließe sich, wie schon angedeutet, damit recht wohl vereinigen. Einige wenige Fett- und Lipoidbestimmungen im Blute der beiden Leukämiker haben uns einen gewissen Anhalt dafür geboten, daß mit der Abnahme der Leukocytose auch eine Abnahme der Fette und Lipoide einhergeht.

Wir verfehlen schließlich nicht, auf eine interessante Tatsache aufmerksam zu machen, die uns bei Gelegenheit der Verabreichung von Benzol an nicht Leukämische aufgestoßen ist. Wenn wir z. B. Tabelle V und VI miteinander vergleichen, so zeigt sich in ihnen ein bemerkenswerter Gegensatz in der Ausscheidung freier und gepaarter Schwefelsäuren und in der Verhältniszahl A/B: In Tabelle V wird bei dem Betreffenden (es handelte sich ebenso wie in VI um einen Rekonvaleszenten) nach Benzoldarreichung in dem Verhältnis A/B zeitweise ein außerordentlich sprungweises und ungleichmäßiges Verhalten und, wie auch bei Leukämikern während der Benzolbehandlung, an einzelnen Tagen ein starkes Sinken der Ausscheidung der freien Schwefelsäure bis auf minimale Zahlen beobachtet, während die Ausscheiduug der gepaarten Schwefelsäuren ziemlich konstant

bleibt. Am nächsten Tage schnellt dann die Ausscheidung der freien Schwefelsäure wieder in die Höhe (Tabelle V, z. B. am 23., 24. und 25. September und 7. und 8. Oktober). Etwas Ähnliches ist bei dem Fall von Tabelle VI nicht zu beobachten, vielmehr zeigt hier das Verhalten der Ausscheidung der freien und gepaarten Schwefelsäuren bei Benzolzufuhr einen gleichmäßigeren Gang und ziemliches Gleichbleiben der Verhältniszahl A/B mit Ausbleiben der starken Schwankungen. Augenscheinlich liegt hier der Grund für die Verschiedenheit in den unbekannten verschiedenartigen Verhältnissen der Konstitution, die es bewirkt, daß bei einzelnen Menschen Benzol, wenigstens nach dieser Hinsicht, in ähnlicher Weise auf sie einwirkt, wie bei den Leukämikern.

Über den Kohlenhydratumsatz isolierter Amphibienmuskeln und über die Beziehungen zwischen Kohlenhydratschwund und Milchsäurebildung im Muskel.

Von

J. Parnas und **Richard Wagner** (Wien).

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 6. März 1914.)

Mit 3 Figuren im Text.

Inhaltsübersicht.

In dieser Arbeit soll die alte Frage nach den Beziehungen der Kohlenhydrate zur Muskeltätigkeit und zur Entstehung der Milchsäure im Muskelgewebe einer neuen experimentellen Be-

arbeitung unterzogen werden. Dies bedarf einer einleitenden Rechtfertigung: denn es könnte scheinen, daß diese Frage, die sich bald nach der Entdeckung des Glykogens und der Milchsäure und ihrer gegenläufigen Wandlungen im tätigen Muskel dem Forscher aufdrängte, durch die zahlreichen und zum Teil ausgezeichneten Arbeiten, die sich mit ihrer experimentellen Aufklärung beschäftigten, genügend durchgearbeitet worden ist.

Wir wollen hier diese Arbeiten nicht ausführlich wiedergeben, sondern verweisen auf die Referate von O. von Fürth[1]) und von Pflüger[2]); hier soll nur auf einige, allen älteren Arbeiten gemeinsame Lücken aufmerksam gemacht werden, die es unmöglich machen, aus den vorliegenden experimentellen Daten eine völlig befriedigende Vorstellung von den Wandlungen der Kohlenhydrate im Muskel und von ihrem Zusammenhang mit der Milchsäurebildung zu gewinnen. Diese Lücken bestehen sowohl in der Art, wie die Kohlenhydrate der Muskeln bestimmt worden sind, wie auch in der Unkenntnis der Bedingungen, unter denen Milchsäure im Muskel gebildet wird.

In den Arbeiten, die sich mit den Wandlungen des Kohlenhydratgehaltes der Skelettmuskeln befaßten, ist stets nur das Glykogen[3]) bestimmt worden[4]): Der Gehalt an niedrigmolekularen Kohlenhydraten, die im Muskel von vornherein ent-

---

[1]) Ergebnisse der Physiol. 2, 1, 580 bis 600, 1903.

[2]) Das Glykogen, II. Aufl., 1906, 411 bis 433.

[3]) In den Versuchen über den Kohlenhydratwechsel des Herzmuskels, in welchen das Herz mit einer Nährlösung durchspült wurde, hat man im Gegensatz dazu den Glykogengehalt fast immer vernachlässigt, bis die Arbeiten von Cruickshank und Patterson, Journ. of Physiol. 47, 381, 1914, auf die Bedeutung dieser Fehlerquelle aufmerksam gemacht haben.

[4]) Die Methode, der sich Otto Nasse bedient hat, bestimmte das Glykogen nach Behandlung des Gewebes mit Speichel und wäre vielleicht geeignet gewesen, die Gesamtkohlenhydrate zu fassen, wenn nicht ein großer Teil der komplexen Kohlenhydrate der Verzuckerung entgangen wäre; die Werte von Nasse mußten, wie dieser Forscher später angegeben hat, mit 2,3 multipliziert werden, um den wahren nahe zu kommen (Arch. f. d. ges. Physiol. 2, 97, 1869, sowie Herrmanns Handb. d. Physiol. 1, 240, 1879). J. Ranke (Tetanus 1865, 168) hat den Zusammenhang zwischen Muskeltätigkeit und dem Gehalt an Traubenzucker zuerst entdeckt; er kannte und berücksichtigte aber das Glykogen der Muskeln nicht.

halten sind oder bei den studierten Veränderungen entstehen, wurde nicht berücksichtigt. Die Glykogenwerte allein lassen aber nicht erkennen, welcher Teil des beobachteten Glykogenverlustes auf eine diastatische Spaltung, welcher aber auf eine Überführung der Stoffe, die keine Kohlenhydrate sind, zurückzuführen ist. Bei einer Bestimmung der Kohlenhydrate, in die das Glykogen diastatisch gespalten worden ist, kommt aber nicht nur Glucose in Frage: Zwar ist nicht nachgewiesen, daß im frischen Muskel Maltose, Isomaltose und Dextrine vorkommen [1]), es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß sie sich unter irgend welchen Umständen bilden. Die Versuche, die hier mitgeteilt werden sollen, haben uns gezeigt, daß sich zwar unter vielen Umständen der Glykogengehalt des Muskels seinem Kohlenhydratgehalt annähernd proportional ändert, daß aber unter manchen Umständen, besonders in absterbenden Muskeln, der Glucosegehalt stark vermehrt ist und daß auch Fälle vorkommen, in denen die Summe von Glykogen und Glucose nur 50 % der gesamten vorhandenen Kohlenhydrate ausmacht (s. Tafel 4 und 5).

Aus diesen Gründen sagen die Versuche, in denen Abnahmen von Glykogen beobachtet worden sind, nichts Sicheres über den Kohlenhydratschwund aus; diejenigen aber, in denen, wie in den schönen Versuchen von R. Böhm [2]) keine Glykogenabnahme bei der Totenstarre beobachtet wurde, sagen nur aus, daß hier die Säure nicht aus Glykogen gebildet worden ist: auf eine Unabhängigkeit von dem Kohlenhydratschwund läßt sich auch aus diesen Versuchsresultaten nicht sicher schließen.

Ein zweiter Grund, der es unmöglich macht, aus den Ergebnissen älterer Untersuchungen die Beziehungen zwischen Milchsäurebildung und Kohlenhydratschwund sicher zu beurteilen, liegt darin, daß die Bedingungen der Milchsäureentstehung im Muskel bis zum Erscheinen der grundlegenden Forschungen von Fletcher und Hopkins [3]) unbekannt geblieben sind.

[1]) Gegen das Vorkommen von Maltose im Muskel sprechen die Versuche von Panormoff (Zeitschr. f. physiol. Chem. **17**, 596, 1894), gewichtig für die Anwesenheit niederer Polysaccharide im Muskelbrei die Befunde von W. A. Osborne und S. Zobel (Journ. of Physiol. **26**, 282, 1901).

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. **23**, 52, 1880.

[3]) Journ. of Physiol. **35**, 247 ff., 1906.

Bis dahin konnte eine Zusammenstellung der Resultate[1]) nur ein sehr unklares und widerspruchsvolles Bild von dem Zusammenhang ergeben, der zwischen den Zustandsänderungen der Muskeln und ihrem Milchsäuregehalt besteht: dies lag keineswegs an der Unvollkommenheit der analytischen Bestimmungsmethoden, sondern, wie Fletcher und Hopkins lehrten, daran, daß die meisten Manipulationen, die man gewohnheitsmäßig für die Vorbereitung der Muskeln zur Analyse anwandte, schon allein das Säurebildungsmaximum herbeiführten. So erwiesen sich Eingriffe, wie Zerkleinerung der Muskeln, Behandlung mit Alkohol bei Zimmertemperatur oder in der Siedehitze, Kochen, Behandlung mit Chloroform, als verhängnisvoll und geeignet, die im Versuch herbeigeführten Änderungen zu verdecken.

Fletcher und Hopkins haben aber auch gelehrt, wie man alle diese Fehlerquellen mit Sicherheit vermeiden kann und wie man den Milchsäuregehalt des Muskels in dem Augenblick, wo es das Experiment erfordert, ohne erhebliche Änderung festzulegen vermag. Sie untersuchten die Milchsäurebildung im Froschmuskel unter mannigfaltigen experimentellen Bedingungen; ihre Resultate haben in der Bestimmtheit der Bedingungen und in ihrer analytischen Exaktheit geradezu den Charakter von Naturkonstanten und stellen ein breites und zuverlässiges Fundament dar, auf dem sich die Erforschung der chemischen und energetischen Vorgänge im Muskel in den letzten Jahren entwickelt hat.

Die Aufgabe, die wir uns stellten, war folgende: Es sollten die Umwandlungen der Kohlenhydrate im Muskel mittels einer Methode, die den Gesamtgehalt berücksichtigt und unter Bedingungen, die sich denjenigen von Fletcher und Hopkins anschließen und einen Vergleich zwischen Kohlenhydratschwund und Milchsäurebildung gestatten, untersucht werden. Die Resultate sind auf den folgenden Seiten wiedergegeben.

Methoden.

Alle Versuche wurden an männlichen Fröschen (Rana temporaria) in den Monaten Oktober bis Februar ausgeführt. Die Tiere stammten aus der Rheinebene (Umgebung von Kehl)

[1]) Siehe z. B. v. Fürth, Ergebnisse d. Physiol. 2, 1, S. 589ff.

und wurden in der gleichen Weise gehalten. Vor dem Versuch wurden sie für 2 bis 4 Stunden in Eis verpackt und so auf 0° abgekühlt; nachdem sie ganz träge geworden waren, wurden die Hinterschenkelpräparate angefertigt [1]).

Der Kohlenhydratgehalt der ruhenden Muskeln beträgt etwa 1 %, der Milchsäuregehalt etwa 0,01 %, auf das Gewicht der frischen Muskeln bezogen. Wenn also eine Milchsäurebildung von 0,1 % des Muskelgewichtes eingetreten ist, so beträgt im Fall, daß ihr eine ebenso große Abnahme des Kohlenhydratgehaltes entspricht, die Milchsäurebildung 1000 % des Anfangswertes, der Kohlenhydratschwund dagegen nur 10 % des Anfangswertes. Diese Verhältnisse bedingen die Hauptschwierigkeit einer Untersuchung der Beziehungen beider Körper; nur Mittelwerte aus großem Versuchsmaterial lassen sich hier vergleichen.

Man kann entweder so verfahren, daß man die Bestimmungen an einer großen Zahl von Tieren unter gleichen Versuchsbedingungen ausführt und miteinander vergleicht; so verfuhr z. B. E. J. Lesser in seinen Versuchen über den Einfluß der Anoxybiose auf den Glykogengehalt der Frösche [2]). Hier kann man bei der Aufarbeitung von etwa 50 Tieren schon leidlich konstante Mittelwerte gewinnen. Der Glykogengehalt der Frösche ändert sich aber im Laufe der Winterschlafperiode, bei Temporarien vom Januar ab sehr stark; es werden in dieser Zeit die Schwankungen der aus je 10 Tieren gewonnenen Kohlenhydratwerte immer größer. Wir gingen deshalb in dieser Zeit dazu über, bei Gruppen von je etwa 10 Tieren den Kohlenhydratgehalt der Schenkel der einen Seite mit der der anderen zu vergleichen. Nun ist es bei der Verarbeitung einer größeren Anzahl von Tieren nicht möglich, die Hinterschenkelpaare ohne Verletzung der Muskeln so durchzutrennen, daß die einzelnen Schenkel zugleich in beliebigen Versuchen zu verwenden wären. Nachdem wir die Erfahrung gemacht haben, daß die mechanische Verletzung der Muskeln keine sofort eintretende Veränderung des Kohlenhydratgehaltes bedingt, schnitten wir das eine Bein des Präparates am Hüftgelenk ab und verarbeiteten es sofort als Kontroll- (Ruhe-) Versuch. Das andere, unverletzte,

[1]) Zeitschr. f. biol. Techn. u. Meth. 2, 53, 1912.

[2]) Zeitschr. f. Biol. 56, 467, 1911; 60, 388, 1913.

mit dem Beckengürtel in Verbindung gebliebene Bein wurde dann für den eigentlichen Versuch benutzt. Die genaue Übereinstimmung des Glykogengehaltes in symmetrischen Froschmuskeln wurde von Grode und Lesser[1]) nachgewiesen.

Die Anordnung der Versuche und der Reizung soll bei den einzelnen Versuchen beschrieben werden.

Die Abtötung der Muskeln geschah immer genau nach dem Vorgang von Fletcher und Hopkins durch Zerdrücken der abgekühlten, in demselben Augenblick von den Knochen abgelösten Muskeln unter eiskaltem Alkohol. Die Gewichte der angewandten Muskeln wurden durch Wägung der Schenkelpräparate vor und nach dem Abpräparieren der Muskeln ermittelt. Wenn wir nur den Gehalt an Glykogen und an Traubenzucker an den Muskeln bestimmen wollten, so wurden die abgetöteten Muskeln noch dreimal mit 60°/₀ Alkohol ausgezogen, im Rückstand das Glykogen nach Pflüger, im Auszug nach Verdampfung des Alkohols, Klärung und Entfernung der stickstoffhaltigen Extraktivstoffe mit Quecksilbersalzen (Nitrat oder Acetat) die Glucose nach Bertrand bestimmt.

Nun gibt uns aber wie oben ausgeführt wurde, die Bestimmung dieser zwei Kohlenhydrate noch kein Bild von dem Kohlenhydratbestand eines Muskels. Hätte man in einem Muskel experimentell Glykogenschwund erzeugt, ohne daß eine diesem Schwund entsprechende Vermehrung des Traubenzuckergehalts zu finden wäre, so könnte daraus nicht auf den Übergang des verschwundenen Glykogens in einen Körper, der kein Zucker ist, geschlossen werden, solange eine bei Zwischenprodukten stehengebliebene Diastasewirkung nicht ausgeschlossen ist; niedrige Dextrine, Maltose, Isomaltose, müßten sich dem Nachweis entziehen. Aus diesem Grunde gingen wir zu einem Verfahren über, das die Bestimmung sämtlicher Glucose ermöglichte, die im Muskel als Bestandteil des Glykogens und aller Produkte seiner hydrolytischen Spaltung enthalten ist.

Die in Alkohol abgetöteten Muskeln wurden durch Mull[2]) von der alkoholischen Lösung getrennt (Filtrat A); darauf in siedendes Wasser gebracht (bei der Verarbeitung von 10 bis 20 Schenkeln in 200 ccm Wasser). Nach kurzem Kochen wur-

[1]) Zeitschr. f. Biol. **60**, 378, 1913.

[2]) Reinen stärkefreien Mull von 20 bis 24 Fäden pro ccm.

den die Muskeln wieder über Mull filtriert, in einem Mörser zerstampft, noch zweimal mit der gleichen Menge Wasser ausgekocht, und jedesmal ausgepreßt; die Filtrate wurden vereinigt (Filtrat B).

Im Muskelrückstand wurde sofort nach Pflüger das Glykogen (als Glucose nach Bertrand) bestimmt. Das Filtrat B enthält die im Muskel enthaltenen einfachen Zucker, die Dextrine und einen kleinen Teil des Glykogens; um das Glykogen und die Dextrine in niedere Zucker überzuführen, wird das Filtrat B mit verdünnter Säure kurz invertiert. Es wird dem Filtrat so viel Salzsäure oder Schwefelsäure zugefügt, daß die Säurekonzentration 2% beträgt; dabei fällt ein Eiweißkörper aus, wahrscheinlich das von v. Fürth im Fischfleisch gefundene Myoproteid[1]); wir möchten das reichliche Vorkommen dieses Körpers im Fleisch des R. temporaria hervorheben[2]). Arbeitet man mit Salzsäure, so fällt dieser Eiweißkörper grobflockig, sehr gut filtrierbar aus; fällt man ihn aber mit Schwefelsäure, so ist es ratsam, vor der Fällung eine kleine Menge Talcum zuzusetzen, da der Niederschlag sonst schwer filtrierbar ist. Die saure Flüssigkeit wird vor dem Filtrieren 2 bis 4 Stunden auf 100° erhitzt.

Ursprünglich hydrolysierten wir die Lösung mit Salzsäure und entfernten nach der Filtration die Salzsäure mit Bleioxyd so weit, daß die Lösung nicht mehr auf Kongo, wohl aber auf Lackmus sauer reagierte; später gingen wir zu dem viel bequemeren Invertieren mit Schwefelsäure über, die dann mit Barytlauge neutralisiert und entfernt wurde. Auf eine genaue Entfernung der Barytsalze muß dabei geachtet werden, da diese sonst bei der Bertrandschen Zuckerbestimmung stören können[3]).

Gleichzeitig mit der Behandlung des Filtrats B wird das alkoholische Filtrat A, das mit 100 ccm Wasser versetzt und schwach angesäuert worden ist, auf dem Wasserbad eingeengt;

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 36, 230, 1895.

[2]) Die Auskochungen enthalten viel mehr dieses Eiweißkörpers, wenn die Muskeln ruhend oder erholt verarbeitet waren, als wenn saure (ermüdete oder starre) Muskeln zur Verwendung kamen: dies hängt offenbar mit der Fällbarkeit des Myoproteids durch Säuren zusammen.

[3]) Zitiert nach R. Boehm, Arch. f. d. ges. Physiol. 23, 60, 1880

nach Verdampfung des Alkohols scheiden sich die Fette ab. Die wässerige Lösung wird mit Calciumkarbonat oder Soda neutralisiert und mit dem jetzt ebenfalls neutralisiertem Filtrat B vereinigt.

In den vereinigten Filtraten (A + B) werden die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe beseitigt. Schon Meißner wußte, daß der Muskelzucker nur nach der Entfernung dieser Stoffe (durch Kupferacetat oder Bleiacetat) bestimmbar ist; wir wenden das Mercuriacetat an, das nach Neuberg[1]) an Fähigkeit, stickstoffhaltige Extraktivstoffe niederzuschlagen, allen anderen Salzen überlegen ist[2]). Zu der neutralen Lösung wird das Mercuriacetat in warmer konzentrierter Lösung hinzugefügt; man nimmt kleine Proben der Flüssigkeit heraus und prüft mit Sodalösung, ob das Quecksilbersalz im Überschuß zugegen ist: solange ein weißer Niederschlag gefällt wird, fehlt es an Quecksilbersalz. Sobald das Mercuriacetat in Überschuß zugegen ist, stumpft man die essigsaure Reaktion mit Soda ab und filtriert; im Filtrat wird das Quecksilber mit Schwefelwasserstoff gefällt, Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom entfernt, die Lösung eingeengt, durch Zusatz von Salzsäure auf eine Reaktion gebracht, die Kongopapier gerade zu bläuen beginnt, dann wird noch $^1/_{50}$ des Volumens (das etwa 100 ccm betragen soll) an HCl zugefügt, $1^1/_2$ Stunden lang auf 100^0 erhitzt, neutralisiert, auf 150 bis 250 ccm aufgefüllt: in dieser Lösung wird die Glucose nach Bertrand bestimmt. Die Bestimmung gelingt sehr glatt, wenn man es vermieden hat, die Lösung sehr salzreich zu machen; wenn dies der Fall ist, so fällt bei der Reduktion schwer filtrierbares gelbes Oxydul aus und man muß dann die Bestimmung mit einer aufs Doppelte verdünnten Probe der Lösung wiederholen.

Die Summe der Glucose, die im unlöslichen Rückstand der Muskeln als Glykogen bestimmt wurde, und derjenigen, die in den vereinigten Filtraten A + B nach der Inversion gefunden wurde, ergibt die gesuchte Menge der Kohlenhydrate.

---

[1]) Diese Zeitschr. **24**, 430, 1910; **43**, 505, 1912. — Neuberg, Der Harn, 1911, S. 328.

[2]) Das Mercurinitrat ist für unseren Zweck nicht brauchbar, da in der Lösung später eine Inversion mit Mineralsäure vorgenommen werden muß und die Salpetersäure oxydierend wirken würde.

Man kann nach diesem Verfahren mühelos zu Zweien 10 Bestimmungen in 3 Tagen ausführen.

Ergebnisse.

Der Kohlenhydratgehalt der ruhenden Muskeln.

Tabelle I.

Nr.	Datum	Gewicht der Muskeln g		Gewicht des Glykogens als Glucose	Gewicht der freien Glucose g	Glykogen %	Glucose %	Summe d. Kohlenhydrate %	
1	4. XI.	68,1	348,0	0,712	0,103	1,07	0,03	1,10	Glykogen in einzelnen Versuchen. Glucose in den vereinigten Versuchen 1 bis 5 bestimmt.
2	4.	66,1		0,725		1,09		1,12	
3	4.	75,4		0,775		1,02		1,05	
4	4.	65,4		0,657		1,00		1,03	
5	4.	72,8		0,662		0,91		1,94	
6	24. XI.	79,0		0,935		1,20		1,20	
7	27.	63,1	139,4	0,720	0,035	1,19	0,025	1,21	Wie in 1 bis 5.
8	27.	76,3		0,800		1,08		1,10	
9	2. XII.	80,0		Glykog. im Rückst. 0,707	in den Auszügen 0,162	0,884	0,20	1,08	Gesamtkohlenhydrate bestimmt.
								9,83	

Mittelwert: 1,09 %

Es ergibt sich hier nach der Formel[1]):

$$\varepsilon = \pm\sqrt{\frac{S}{n-1}}$$

(n die Anzahl der Beobachtungen, S die Summe der Quadrate der einzelnen Abweichungen vom Mittel) die mittlere Abweichung der Einzelresultate

$$\varepsilon = \pm 0{,}081\ \%.$$

Der Mittelwert ist:

$$1{,}09 \pm 0{,}03\ \%.$$

Verhalten der Kohlenhydrate des ruhenden Muskels unter anoxybiotischen Bedingungen.

Die Bedingungen dieses Versuchs wurden genau denjenigen angepaßt, die von Fletcher und Hopkins in ihrem Ver-

[1]) S. z. B. Kohlrausch, Lehrbuch der praktischen Physik, 1910, S. 1 ff.

such 12 (l. c. S. 304) eingehalten wurden. Hier überleben die Muskeln bei einer Temperatur von 12,5° in Wasserstoffatmosphäre sehr lange, die Erregbarkeit geht erst nach etwa 60 Stunden verloren.

50 Frösche wurden in der erwähnten Weise vorbereitet, die Schenkelpaare auf einem Glasgestell, das sich unter einer aufgeschliffenen Glasglocke befand, an den Hüftknocken angebunden. Durch die Glocke wurde ein Strom von Stickstoff (käuflicher Stickstoff, durch Pyrogallol gereinigt und befeuchtet) dauernd geleitet. Durch Berieselung mit Leitungswasser wurde die Temperatur auf 12° (in der Glocke gemessen) gehalten. Nach 20 Stunden wurde die Glocke in einen kalten Raum gebracht; nachdem sie auf 0° abgekühlt war (nach 2 Stunden), wurden die Schenkelpaare, zu Gruppen von je 10 vereinigt, verarbeitet.

Glykogen und Glucose wurden gesondert bestimmt, Glykogen in den einzelnen Versuchen, Glucose in den vereinigten alkoholischen Auszügen der fünf Versuche. In einem Teile der alkoholischen Extrakte wurde die Milchsäure bestimmt; die Lösung wurde verdampft, die trübe Emulsion mit etwas Talcum versetzt und mit wenig Äther durchgeschüttelt, dann nach Zusatz von Kochsalzlösung der Äther schnell verdampft. Dabei ballen sich die kolloidalen Stoffe, die auf andere Weise schwer zu beseitigen sind, mit dem Fett zu Tropfen zusammen, die von der klaren Lösung leicht zu trennen sind[1]).

Die Milchsäure wurde im Pregl-Epingerschen Apparat extrahiert; nach Darstellung des Zinklactats wurde der Milchsäuregehalt nach v. Fürth und Charnaß [Modifikation von Embden[2])] bestimmt. Der so nach einem in allen Teilen anderem Vorgehen erhaltene Wert stimmte mit dem von Fletcher und Hopkins erhaltenen vollkommen überein: wir fanden 0,115 % Zinklactat, während Fletcher und Hopkins 0,12 nach 21,15 Stunden gefunden haben.

Der Mittelwert dieser Versuchsreihe gleicht demjenigen, der für die frischen Muskeln gefunden wurde (1,09).

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 89, 39, 1914. M. Oppenheimer hat kürzlich darauf hingewiesen, daß bei einer Klärung nach Rona und Michaelis (mit Eisenoxydhydrat) Milchsäureverluste entstehen. Dieselbe Erfahrung haben wir bei unseren Versuchen auch gemacht und Verluste von etwa 10 % beobachtet.

[2]) S. O. Neubauer im Handb. d. biochemischen Arbeitsmethoden 5, 2, 1257.

Tabelle II.

Nr.	Datum	Gewicht der Muskeln g	Gewicht d. Glykogens als Glucose	Gewicht der freien Glucose	Glykogen %	Glucose %	Summe d. Kohlenhydrate %
10	10.XI.	88,0	verloren		—		—
11	10.	92,0	0,997		1,08		1,12
12	10.	86,9	0,925	0,175	1,06	0,04	1,10
13	10.	83,0	0,897		1,08		1,12
14	10.	86,7	0,875		1,01		1,05
		436,6					4,39

Mittelwert: 1,097 %

Die mittlere Abweichung vom Mittelwert ergibt sich zu $\pm 0{,}03\,\%$, der Mittelwert zu $1{,}097 \pm 0{,}019\,\%$, während er für die Normalwerte $1{,}09 \pm 0{,}03\,\%$ beträgt.

Nach den Versuchen von Fletcher und Hopkins wird unter denselben Bedingungen 0,07 % Milchsäure gebildet: dieser Milchsäurebildung entspricht in unseren Versuchen keine Abnahme der Kohlenhydrate.

Der Einfluß mechanischer Verletzung auf den Kohlenhydratgehalt der Muskeln.

Fletcher und Hopkins haben die wichtige Tatsache entdeckt, daß mechanische Verletzung des Muskels, wie sie durch Zerhacken bewirkt wird, eine fast augenblicklich verlaufende Bildung von Milchsäure veranlaßt. Die Milchsäuremenge, die dabei sofort erscheint, beträgt so viel, wie diejenige Menge, die durch Ermüdung des Muskels bei Sauerstoffausschluß entsteht: sie entspricht dem unter physiologischen Bedingungen erreichbaren, noch rückgängig zu machendem Maximum der Milchsäurebildung. Nach der Zerkleinerung steigt der Milchsäuregehalt im Muskelbrei langsamer an, erreicht aber schon nach höchstens 8 Stunden das Plateau der nicht mehr rückgängigen Milchsäurebildung, wie es dem vollständigen Tode der Muskelzellen entspricht. Der Gang des Milchsäuregehaltes in dem zerkleinerten Gewebe ist in der Fig. 1, Kurve A, die dem Versuch 1 von F. und H.[1]) entspricht, dargestellt. Die

[1]) l. c., S. 267. In unserer Kurve stellen die Ordinaten die freie Milchsäure in Prozenten des Muskelgewichts dar, während sie bei Fletcher und Hopkins stets das Zinklactat darstellen.

Bedingungen dieses Versuchs haben wir in unserer Versuchsreihe, die in der folgenden Tabelle und in der Kurve B der Fig. 1 dargestellt ist, eingehalten.

Tabelle III.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
		Ruhewerte						Zerkleinerte Muskeln							
Nr.	Datum	Gewicht	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %	Zeit	Gewicht	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %	Differenz 8—15
26	30.XII.	42,9	421	0,982	78,4	0,183	1,165	0 [1]	42,4	413	0,975	78	0,185	1,160	+ 0,005
27	30.	49,4	464	0,939	—	—	—	0	46,4	421	0,908	—	—	—	
28 [2]	30.	43,5	476	1,095	92	0,212	1,303	0	40,5	533	0,314	95	0,235	1,549	-0,246(?)
29	30.	43,4	433	0,997	104	0,239	1,229	0	41,7	421	0,010	92	0,222	1,233	— 0,004
30	30.	34,6	338	0,975	73	0,210	1,185	0	33,7	325	0,963	64	0,191	1,154	+ 0,031
31	19. I.	31,3	251	0,802	84	0,267	1,069	1^h	30,6	234	0,763	58	0,190	0,953	+ 0,116
32	19.	31,4	246	0,783	79	0,252	1,035	2^h	30,5	196	0,644	65	0,314	0,858	+ 0,177
33	19.	37,2	258	0,692	95	0,256	0,948	3^h	37,0	229	0,619	67	0,182	0,801	+ 0,147
34	19.	34,2	229	0,669	71	0,206	0,875	5^h	34,4	180	0,523	65	0,188	0,711	+ 0,164
35	19.	36,6	241	0,659	85	0,231	0,890	16^h	30,2	106	0,351	68	0,224	0,575	+ 0,315
57 a	26. I.							0^h	31,5	226	0,718	65	0,207	0,925	Diff. 57a bis 57,b + 0,399
57 b								22^h 45′	28,9	94	0,325	58	0,201	0,526	

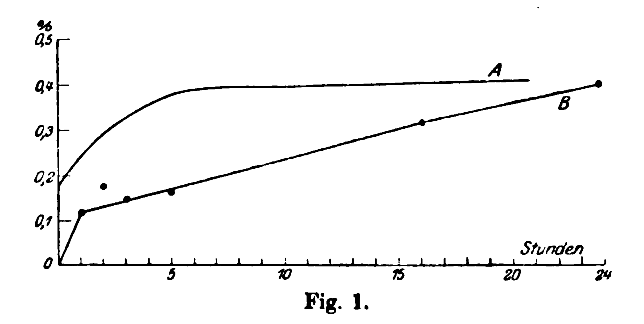


Fig. 1.

In den Versuchen 26 bis 35 wurden Hinterschenkelpräparate von je 10 Fröschen angefertigt, bei einer Temperatur von 0

[1]) In den Versuchen, die mit 0 bezeichnet sind, wurde der Muskelbrei im Augenblick, wo seine Temperatur 15° erreichte, abgekühlt und verarbeitet.

[2]) In diesem Versuch weicht der Glykogengehalt so stark von allen, die wir beobachtet haben, ab, daß wir an einen unaufgeklärten analytischen Fehler glauben müssen.

durch Scherenschnitt die Schenkel abgetrennt und so verarbeitet, daß die unverletzten Beine für die Bestimmung der Ruhewerte, die verletzten für die Zerkleinerungsversuche dienten. In diesen Versuchen wurden die Muskeln von den Knochen abgeschnitten und auf eisgekühlten Tellern mit Schere und Skalpel zu einem feinen Brei zerschnitten, der in großen Probiergläsern in einem auf 15° gehaltenen Wasserthermostaten erwärmt wurde. Sollte der Versuch unterbrochen werden, so wurden die Gläser in Eis abgekühlt und der Brei unter kaltem Alkohol abgetötet. In dem Versuch 57 wurde aus den Muskeln von 10 Tieren der Brei angefertigt, in 2 Teile geteilt, von denen der eine sofort, der andere nach Ablauf der Versuchsperiode verarbeitet wurde.

Aus den Versuchen, die in der Tabelle III vereinigt und in der Kurve B graphisch dargestellt sind, ergibt sich ein vollständiges Bild von dem Kohlenhydratschwund, der durch die ausgiebige mechanische Verletzung der Muskelzellen hervorgerufen wird. Wir werden dessen Verlauf besprechen und mit den Veränderungen des Milchsäuregehaltes vergleichen, die unter den gleichen Bedingungen von Fletcher und Hopkins ermittelt worden sind: wir haben sie in der Kurve A der Fig. 1 aufgezeichnet.

Zunächst ist zu bemerken, daß die Zerkleinerung der Muskeln, die die sofortige Entstehung von 0,18°/₀ Milchsäure bedingt[1]), keinen gleichzeitigen Kohlenhydratschwund zur Folge hat. In der darauf folgenden ersten Stunde erfolgt ein Kohlenhydratschwund, der größer ist, als die gleichzeitige Vermehrung des Milchsäuregehaltes. Von diesem Zeitpunkt ab verläuft der Kohlenhydratschwund längs einer geraden Linie, die durch die Versuche 31, 33, 34, 35 und 57 bestimmt wird; Versuch 32 liegt ein wenig abseits, nach seinem Werte würde der Kohlenhydratschwund in den ersten zwei Stunden noch steiler verlaufen. Aus dem Verlauf dieser Linie ergibt sich, daß die Größe des Kohlenhydratschwundes, die der sofort eingetretenen Milchsäurebildung entsprechen würde, erst nach 6 Stunden bei 15° erreicht wird; und während der Milchsäuregehalt des Muskelbreis immer sanfter

[1]) Im Winter.

ansteigend schon nach 6 Stunden seine Höhe erreicht und dann konstant bleibt, nimmt der Kohlenhydratverlust immer weiter gleichmäßig zu und schneidet endlich das Plateau des Milchsäuregehaltes nach 23 Stunden.

Wir möchten unsere Werte noch zu denjenigen in Beziehung bringen, die Lesser und Grode[1]) ermittelt haben, als sie die Beeinflussung der diastatischen Spaltung des Muskelglykogens durch Zerkleinerung des Gewebes untersuchten. Diese Forscher fanden in Muskeln, die durch Gefrieren und Zerreiben mechanisch zerstört worden sind, in 4 Stunden bei 22 bis 23° einen Glykogenverlust von etwa 0,40% des Muskelgewichts. Unsere Versuche sind bei einer viel niedrigeren Temperatur angestellt worden als die von Lesser und Grode; es läßt sich daher nicht sagen, ob der von Lesser und Grode beobachtete Glykogenschwund in seinem ganzen Betrage einen Kohlenhydratschwund darstellt: jedenfalls aber muß ein erheblicher Teil seines Wertes einen solchen darstellen und nicht nur einer diastatischen, sondern einer glykolytischen Spaltung im zerstörten Gewebe zugeschrieben werden.

Verhalten der Kohlenhydrate in absterbenden Muskeln.

Tabelle IV.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		Frisch						Starr					
Nr.	Datum	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %
36	6.I.	38,5	315	0,818	167	0,435	1,253	43,8	230	0,525	125	0,28[illegible]	0,810
37	6.	39,7	312	0,790	(20[2])	(0,05[2])	—	42,2	200	0,474	(60[2])	(0,142[2])	—
38	6.	33,7	260	0,772	183	0,394	1,166	38,1	188	0,492	81	0,212	0,704
39	6.	29,8	195	0,654	81	0,269	0,923	34,1	112	0,328	115	0,338	0,666
40	6.	38,6	333	0,861	(26[2])	(0,07[2])	—	43,8	254	0,580	(57[2])	(0,13[2])	—

[1]) Zeitschr. f. Biol. 60, 380, 1913.

[2]) Diese Werte beziehen sich auf den Zuckergehalt der alkoholischen Extrakte; in diesen Versuchen sind die wässerigen Auszüge verloren gegangen.

Die Differenzen zwischen dem Kohlenhydratgehalt der frischen und der starren Schenkel.

Nr.	Differenz %	Mittel %
36	0,443	
38	0,462	0,387
39	0,257	

A. Natürliche Starre.

Den Hinterschenkelpräparaten von je 10 Fröschen wurden die einen Schenkel zur sofortigen Verarbeitung entnommen, die anderen, in Verbindung mit dem Beckengürtel gebliebenen, wurden in einer Stickstoffatmosphäre innerhalb von 25 Minuten durch Reizung mit Induktionsströmen bis zur Unerregbarkeit ermüdet; dann wurden sie $14^{1}/_{2}$ Stunden lang bei 10° in einer Stickstoffatmosphäre (dauernder langsamer Strom von käuflichem durch Pyrogallol gereinigtem Stickstoff) gelassen. Nach Ablauf dieser Zeit waren die Muskeln starr. Nach einstündigem Verweilen bei 0° wurden sie auf die gesamten Kohlenhydrate verarbeitet.

B. Chloroformstarre.

Die Hinterschenkelpräparate von 30 Fröschen wurden unter einer Glasglocke in Stickstoffatmosphäre den Chloroformdämpfen — der Stickstoffstrom strich durch eine mit Chloroform beschickte Waschflasche — bei 13° während 14 Stunden ausgesetzt. Die Starre tritt während dieser Zeit ein, die Muskeln scheiden dabei eine dicke Flüssigkeit, die viel Eiweiß enthält, ab; ihr Gewicht wurde durch Wägung der Schenkelpräparate vor und nach dem Erstarren ermittelt. Die Gewichte der abgeschnittenen Muskeln wurden danach korrigiert, indem das Gewicht der ausgetretenen Flüssigkeit den Gewichten der einzelnen Portionen proportional verteilt und zu diesen addiert wurde. Ebenso wurde das in

Tabelle V.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nr.	Datum	Gewicht g	Gewicht korr. g	Glykogen mg	Glykogen korr. %	Glucose korr. mg	Glucose korr. %	Summe korr. %	
15	27. XI.	64,5	93,9	413	0,463			0,515	
16	27.	66,9	97,4 } 290,7	338	0,361	146	0,052	0,413	439
17	27.	61,4	89,4	290	0,338			0,390	
24	11. XII.	158,4	158,4	625	0,377	725	0,437	0,815	Dauer d. Versuchs: 15 Std. Ausgetretene Flüssigkeit mit den Muskeln verarbeitet.

der ausgetretenen Flüssigkeit bestimmte Glykogen und Zucker zu den in den Muskeln gefundenen Werten hinzugefügt. Die Aufarbeitung auf Glykogen geschah in einzelnen Gruppen von je 10 Tieren, die Glucose wurde in den vereinigten alkoholischen Extrakten bestimmt. In dem Versuch 24 wurden an 20 Tieren die gesamten Kohlenhydrate bestimmt; die Präparate wurden erst nach dem Erstarren gehäutet.

C. Wärmestarre.

Die Frösche wurden gehäutet und die Hinterschenkelpräparate von 30 Tieren in einer Pulverflasche in das auf 45° erwärmte Wasserbad versenkt. Die Temperatur wurde im Inneren des Gefäßes gemessen: als die Temperatur 45° erreicht hatte, waren die Muskeln bereits wärmestarr. Wie bei der Chloroformstarre, so trat auch hier eine eiweißreiche Flüssigkeit aus den Muskeln aus; der dadurch entstandene Gewichtsverlust wurde in einem parallelen besonderen Versuch ermittelt und zu 12% gefunden; mit diesem Wert wurden die Gewichte der abpräparierten Muskeln korrigiert. In der ausgetretenen Flüssigkeit wurden Glykogen und Glucose bestimmt. Das Glykogen wurde in Gruppen von 10 Tieren, Glucose in den alkoholischen Auszügen aller 30 Tiere bestimmt.

Tabelle VI.

1	2	3	4		5	6	7	7	9	10
Nr.	Datum	Gewicht g	Gewicht korr. g		Glykogen mg	Glykogen korr. %	Glucose korr. mg	Glucose korr. %	Summe korr. %	Mittel
18	24.XI.	73,0	83,9		485	0,585			0,723	
19	24.	66,3	73,3	232,2	432	0,574	320	0,138	0,712	0,716
20	24.	65,0	78,9		425	0,575			0,715	

Betrachten wir die in den letzten drei Tabellen mitgeteilten Versuche, so sehen wir, daß in allen untersuchten Fällen, in denen der Muskel langsam abgetötet wurde, erhebliche Abnahmen im Kohlenhydratgehalt gefunden wurden. In dem Versuch, in dem das natürliche Eintreten der Starre durch Ermüden der Muskeln und Anoxybiose beschleunigt wurde, haben wir durch Bestimmungen des gesamten Kohlenhydratgehaltes in zusammengehörigen Schenkeln sichere Abnahmen im Betrage von 0,387% des Muskelgewichtes oder 34,8% des Anfangswertes gefunden.

Diese Abnahme ist somit ähnlich groß, wie die entsprechende Zunahme an Milchsäure. Fletcher und Hopkins finden für vollständige Starre das Maximum von 0,41% Milch-

säure, für den Zustand, in dem die Reizbarkeit eben verloren gegangen ist, 0,275 %.

Unter den Versuchen über Chloroformstarre haben wir eine Reihe von drei Versuchen, in denen nur Glykogen und Glucose bestimmt wurden; aus diesen ergibt sich — verglichen mit den Normalwerten derselben Zeit — eine sehr große Abnahme: sie beträgt etwa 0,65 % des Muskelgewichts und übertrifft bei weitem alle Abnahmen des Kohlenhydratgehalts, die wir sonst beobachtet haben. Die Größe dieser Abnahme ist jedoch nur scheinbar und beruht nur darauf, daß nicht alle Kohlenhydrate bestimmt wurden; dies geht aus dem Versuch 24 hervor. Hier wurden alle Kohlenhydrate bestimmt und eine Abnahme von 0,3 %, also halb so groß als in den Versuchen 15, 16, 17, festgestellt. Diese Versuchsreihe erscheint uns in methodischer Hinsicht besonders interessant: man sieht hier, daß unter gewissen Umständen weder der Glykogengehalt noch die Summe des Glykogens und des Traubenzuckers ein Bild von dem Kohlenhydratgehalt der Muskeln geben können. Es scheint, daß während der Entwicklung der Chloroformstarre die sonst ausgezeichnet koordinierten diastatischen und glykolytischen Vorgänge nicht mehr parallel gehen, und daß die diastatische Spaltung das Glykogen nicht vollständig in Traubenzucker überführt.

Fletcher und Hopkins finden in Chloroformstarre die Bildung von etwa 0,32 % Milchsäure; dieser entspricht in unserem Versuch 24 (an 20 Tieren) ein Zuckerverlust von etwa 0,25 bis 0,3 %.

In den Wärmestarreversuchen haben wir keine Bestimmungen des gesamten Kohlenhydratgehaltes ausgeführt. Aus den Bestimmungen des Glykogens und der Glucose ergibt sich eine Abnahme der Kohlenhydrate von etwa 0,38 %, also größer als in der Chloroformstarre und in der natürlichen Starre; die Milchsäurebildung beträgt unter den gleichen Umständen etwa 0,4 %. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind außerordentlich gleichmäßig, doch können wir ihnen aus den oben erwähnten Gründen keine große Bedeutung beimessen und wollen auch keine weiteren Schlüsse aus ihnen ziehen.

Aus den Versuchen 37 und 40 (Tabelle IV), in denen die wässerigen Auszüge verloren gegangen waren und nur die im

alkoholischen Extrakt enthaltenen einfachen Zucker bestimmt wurden, geht hervor, daß im starren Muskel die Gesamtmenge der Kohlenhydrate sehr vermindert, die Menge der einfachen alkohollöslichen Zucker gegenüber dem ruhenden Muskel aufs Doppelte vermehrt ist.

Der Kohlenhydratschwund bei Muskeltätigkeit.

Wir reizten die Schenkelmuskulatur direkt mit Induktionsströmen, die allmählich verstärkt wurden, bis die Muskeln bei kleinstem Rollenabstand nicht mehr auf die Reize antworteten. Der Kohlenhydratgehalt der ermüdeten Muskeln wurde entweder mit den normalen Ruhewerten, oder mit dem Gehalt der vor der Reizung abgeschnittenen, dazugehörigen Schenkel verglichen.

Die Anordnung der Versuche war zweierlei. In der ersten benutzten wir ein 20 cm hohes Gerüst aus Glasstäben, das oben und unten je einen festsitzenden Rahmen aus verzinntem Kupferdraht, beide gegeneinander isoliert, trägt. Die viereckigen Rahmen sind nach der Mitte des Gestells zu durch angelötete Drähte mit einer Drahtschlaufe verbunden, in welche die stromzuführenden Drähte leicht einzuführen sind. Das Gestell, dessen Füße paraffiniert sind, steht unter einer Glasglocke, die auf einer Platte gut aufgeschliffen ist; durch einen Stopfen, der die Glocke oben schließt, treten zwei Glasröhren ein, eine endet oben, die andere unten; sie führen die Leitungsdrähte und den Gasstrom zu und ab. Y-förmige Endigungen der Zuleitungsröhren außerhalb der Glocke lassen einerseits die (eingekitteten) Drähte austreten, dienen andererseits der Gasleitung. Die Froschpräparate werden bei dieser Versuchsanordnung zwischen den beiden Rahmen mit durch Ringer-Lösung befeuchteten Baumwollfäden gespannt aufgebunden — verschiedene Farben der Fäden bezeichnen die Zusammengehörigkeit der einzelnen Gruppen —, die Haken der Zuführungsdrähte werden in die Schlaufen der Rahmen gesteckt und dann der Stopfen mit Paraffin abgedichtet (Apparat A).

Diese Versuchsanordnung hat Nachteile, wenn es nötig ist, die Atmosphäre in der Glocke schnell zu wechseln; arbeitet man z. B. abwechselnd in Wasserstoff und in Sauerstoff, so dauert es über 1 Stunde, bis das Knallgas verdrängt ist: man kann, da nur ein gut befeuchteter Gasstrom zugeführt werden darf, keinen allzu schnellen Strom durchsenden, ohne ein Austrocknen der Muskeln befürchten zu müssen. Wir gingen deshalb später zu einer anderen Versuchsanordnung über.

Sie bestand aus einer Glasglocke von 20 cm Höhe und 15 cm innerer Weite, zu der eine aufgeschliffene Bodenplatte von 19 cm Durchmesser gehörte. Durch einen Gummistopfen tritt von oben ein Aluminiumrohr herein, das unter der Wölbung der Glocke spiralförmig zusammengebogen ist; das freie Ende des Rohres endet dicht unter dem

Stopfen. Auf dem Rohr sind 50 kleine Haken aufgereiht, die unter dem Bandapparat des Beckengürtels durchgestoßen werden und zur Aufhängung der Präparate dienen. Die Präparate werden auf dem Rohr außerhalb der Glocke aufgereiht, das gerade Ende des Rohres durch den Stopfen von der inneren Seite der Glocke aus durchgeführt, möglichst hoch hinaufgezogen und dann von außen durch Vergießen mit Piceinkitt befestigt und abgedichtet. Das äußere Ende der Zuleitungsröhre kommuniziert durch einen Dreiweghahn mit der Gasbombe einerseits, mit der Saugpumpe andererseits; die Glocke hängt (ohne Grundplatte) in einem Trog, der etwa 5 l Ringer-Lösung enthält. Man kann mit Hilfe dieser Vorrichtung die Glocke schnell mit Ringer-Lösung füllen und diese sofort durch das Gas, in dem die Muskeln behandelt werden sollen, verdrängen; man kann die mit Gas gefüllte Glocke unter der Flüssigkeit der Grundplatte aufsetzen, oder unter den Flüssigkeitsverschluß allein den Versuch vornehmen (Apparat B).

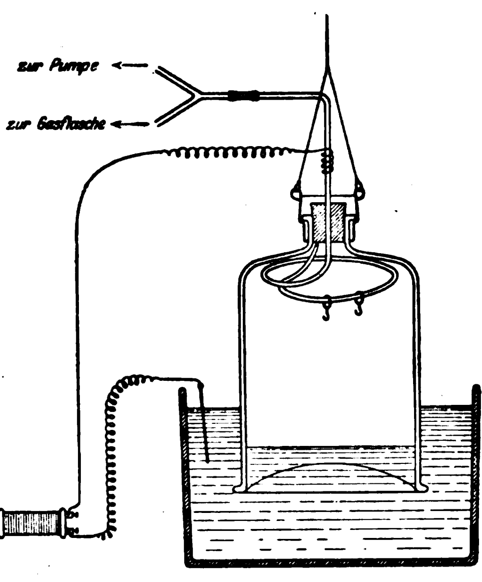


Fig. 2.

Die Stromzuleitung wird an das Metallrohr, das die Präparate trägt und das Gas zuleitet, einerseits angelegt, die andere Elektrode taucht in den Trog mit der Ringer-Lösung; man läßt die Zehen der Frösche bis nahe an das Sprunggelenk in die Ringer-Lösung tauchen (Fig. 2).

Versuche bei Sauerstoffabschluß.

Wir wollen hier zuerst Versuche erwähnen, die in Stickstoffatmosphäre ausgeführt waren und bei denen die Muskeln durch Einzelschläge gereizt wurden. In einer Versuchsreihe (21 und 22) gelangten von 40 angesetzten Tieren nur 20 in zwei Gruppen zur Verarbeitung auf Glykogen, die Extrakte beider zusammen auf Glucose. Hier wurden die Präparate in dem Apparat *A* durch Ströme zweier Akkumulatoren, die durch ein Metronom unterbrochen einem Induktorium ohne Unterbrecher

bei einem Rollenabstand *O* zugeleitet wurden, während 2 Stunden alle Sekunden gereizt. Vor der Reizung befanden sich die Präparate 14 Stunden in Stickstoff.

Tabelle VII.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nr.	Datum	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen °/₀	Glucose mg	Glucose °/₀	Summe °/₀	Temperatur °C
21	2. XII.	94,5 } 187,8	1059	1,121	} 104	} 0,055	1,176	12
22	2.	93,3 }	952	1,020			1,075	12
23	5.	116,1	950	0,818	213	0,183	1,001	12 { Hier wurden die Gesamt-Kohlenhydrat bestimmt.

In dem Versuch 23 waren 12 Präparate in 4 Ketten zu je 3 Schenkelpaaren in einem weiten Glasrohr, das durch paraffinierte Stopfen geschlossen war, mittels Stahlfedern aufgespannt. Vor der Reizung, die wie in den Versuchen 21 und 22 während $1^3/_4$ Stunden erfolgte, blieben die Präparate 14 Stunden im Stickstoff.

Die Resultate dieser Versuche sind nicht deutlich; es sind ihrer zu wenige, um mit den Normalversuchen, von denen sie wenig abweichen, verglichen werden zu können. In den Versuchen 21 und 22 entspricht der Kohlenhydratwert demjenigen der Normalversuche, im Versuch 23 ist er ein wenig kleiner. Jedenfalls ist es bemerkenswert, daß in diesen Versuchen, in welchen den Muskeln etwa 7000 Reizschläge zugeführt wurden, sicher eine nur sehr kleine Kohlenhydratabnahme stattgefunden haben kann; wir haben aber keine Anhaltspunkte für die Schätzung der Milchsäuremenge, die dabei gebildet wurde.

In der Versuchsreihe, in der die tetanische Reizung bis zur weitgehenden Ermüdung fortgesetzt wurde, haben wir die zusammengehörigen Schenkel der gleichen Präparate verglichen.

30 Fröschen wurden nach der gewöhnlichen Vorbereitung bei 0° die einen Hinterschenkel abgeschnitten und zur sofortigen Verarbeitung in Eis gelegt. Die anderen, unverletzten Schenkel wurden am Beckengürtel und an den Fersen im Apparat *A* aufgespannt, in $3^1/_2$ Stunden

eine reine Stickstoffatmosphäre erzeugt: durch die Probe mit Pyrogallol[1]) wurde die Abwesenheit von Sauerstoff erwiesen. Die Reizung begann darauf bei einem R. A. = 15 cm mit den Strömen zweier Akkumulatoren; in 1 Minute wurden 54 Tetani von je 0,1 Sekunde Dauer erzeugt, die Muskeln zuckten isometrisch. Innerhalb der ersten 22 Minuten wurde der Rollenabstand auf 8 cm gebracht, nach 55 Minuten waren die Muskeln bei einem R. A. = 0 unerregbar; nach 10 Minuten langer Unterbrechung kehrte eine schwache Reizbarkeit zurück, die bei Reizung sofort verschwand, die Muskeln wurden noch 5 Minuten gereizt. Nach einem halbstündigen Aufenthalt bei 0° wurden die Muskeln, wie die vorher sofort aufgearbeiteten Schenkel, auf die Gesamtkohlenhydrate verarbeitet. Temperatur 9°.

Tabelle VIII.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		Frisch						Nach Reizung					
Nr.	Datum	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %
41	12. I.	29,0	244	0,841	68,5	0,236	1,077	32,6	205	0,631	78	0,238	0,869
42	12.	36,4	325	0,893	92,0	0,252	1,145	37,2	251	0,676	85	0,227	0,903
43	12.	45,6	400	0,877	88,0	0,193	1,070	45,7	300	0,656	87	0,190	0,846

Nr.	Differenz 8—14 %	Mittelwert %
41	0,208	
42	0,242	0,225
43	0,224	

30 Frösche wurden in der beschriebenen Weise präpariert, die Kontrollschenkel entnommen, die unverletzten Teile der dazugehörigen Präparate in dem Apparat *B* aufgehängt. Die Luft wurde verdrängt, durch Wasserstoff ersetzt und nach dieser Operation, die einige Minuten dauerte, die Reizung begonnen. Die Temperatur des Raumes und der Ringer-Lösung betrug 5°; die Reizung wurde bei einem R. A. = 18 cm mit den Strömen zweier Akkumulatoren begonnen und dann innerhalb 58 Minuten unter Verminderung des Rollenabstandes bis Null ununterbrochen bis zur Unerregbarkeit gereizt. In den Kontrollschenkeln und den Versuchsschenkeln wurden die Gesamt-Kohlenhydrate bestimmt.

[1]) Nach Fletcher und Hopkins: In einem Gefäß, durch das der Gasstrom streicht, befinden sich getrennt Pyrogallol und Lauge; soll die Probe angestellt werden, so vermischt man beide Reagenzien.

Tabelle IX.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		Frische Muskeln						Ermüdete Muskeln					
Nr.	Datum	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %
58	3. II.	40,8	300	0,735	67	0,164	0,899	44,5	280	0,629	78	0,139	0,768
59	3.	40,5	276	0,683	55	0,135	0,818	37,3	184	0,493	42	0,113	0,606
60	3.	41,3	280	0,679	67	0,163	0,842	44,7	213	0,476	90	0,201	0,677
						Mittelwert	0,853					Mittelwert	0,717

Nr.	Differenz 8—14 %	Mittelwert %
58	0,131	0,169
59	0,212	
60	0,165	

Versuche in Sauerstoff.

Die Versuche in Sauerstoffatmosphäre wurden ebenso ausgeführt wie die analogen Versuche in Stickstoff.

30 Frösche wurden präpariert und in dem Apparat *A* in eine Sauerstoffatmosphäre gebracht. Nach $2^1/_2$ Stunden wurde mit der Reizung begonnen; die Reizung erfolgte wie in den Versuchen 41, 42, 43, sie wurde immer $^1/_4$ Stunde fortgesetzt und für die gleiche Zeit unterbrochen; nach 6 Reizperioden überließen wir die Muskeln für 13 Stunden der Erholung und setzten die Reizung in der gleichen Weise in 7 Reizperioden fort. Temperatur 12°. Nach Abkühlung erfolgte dann die Verarbeitung, eine Gruppe wurde auf Gesamtkohlenhydrate, zwei auf Glykogen und Glucose verarbeitet.

Tabelle X.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nr.	Datum	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %	Methode
44	11.XII.	99,4	600	0,603	262	0,264	0,867	Gesamtkohlenhydrate
45	11.	84,4 } 172,3	768	0,91	95	0,055	0,975	Glykogen + Glucose
46	11.	87,9	826	0,94			0,995	Glykogen + Glucose

Vergleichen wir den Mittelwert dieser Versuche (0,945 %) mit dem Mittelwert der Ruheversuche (1,09 $\pm$ 0,03), so ergibt sich eine sicher außerhalb der Fehlergrenze liegende Abnahme der Kohlenhydrate. Wir werden aber diese Versuche hier nicht näher diskutieren, da im folgenden über deutlichere Ergebnisse berichtet werden soll.

Die Tiere wurden wie gewöhnlich vorbereitet, die Kontrollschenkel abgetrennt und die Präparate in dem Apparat *A* aufgespannt. Temperatur 9,5°. Die Reizung wurde mit den Strömen zweier Akkumulatoren bei dem Rollenabstand 17 cm begonnen, das Metronom lieferte 60 Tetani von weniger als 0,1′ Dauer in der Minute. Die Reizung wurde während 6h 15′ mit einigen Unterbrechungen fortgesetzt, so daß die Summe der Reizperioden 2h 50′ betrug.

10 Tiere wurden dann verarbeitet (Versuch 47), andere 10 noch 15 Stunden im Sauerstoff belassen und dann 40 Minuten lang gereizt (Versuch 49); die Muskeln waren noch erregbar.

Tabelle XI.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Nr.	Datum	Frische Muskeln						Gereizte Muskeln					
		Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %
47	13. I.	32,3	276	0,855	71	0,218	1,073	31,2	200	0,64	56	0,176	0,816
49	13.	35,0	280	0,800	67	0,191	0,991	35,7	196	0,55	62	0,174	0,724

Nr.	Differenz 8—14 %
47	0,257
49	0,267

Versuche über anoxybiotische Ermüdung und Erholung in Sauerstoff.

In den vorhergehenden Versuchen in Sauerstoff gehen zwei Hauptprozesse, die Bildung und das Verschwinden von Milchsäure, nebeneinander her; man kann daher aus ihnen keinen eindeutigen Aufschluß über die Beziehungen zwischen Milchsäurebildung und Kohlenhydratschwund gewinnen. Wir suchten also den Einfluß des Sauerstoffs auf den Kohlenhydratschwund

zu analysieren, indem wir anoxybiotisch ermüdete Muskeln mit solchen verglichen, die nach der Ermüdung bis zur Erholung und Wegschaffung eines großen Teils der Milchsäure in Sauerstoff gehalten worden waren.

In einem orientierenden Versuch reizten wir Hinterschenkelpräparate bis zur Ermüdung in Wasserstoff und ließen dann während der Erholungspausen Sauerstoff hinzutreten. Drei Reizperioden von je 1 Stunde wechselten mit mehrstündigen Erholungspausen ab. Temperatur 10°. Gruppen von je zehn Fröschen wurden auf Gesamtkohlenhydrate verarbeitet.

Tabelle XII.

1	2	3	4	5	6	7	8
Nr.	Datum	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %
50	18.XII.	93,4	709	0,76	115	0,123	0,883
51	18.	88,9	622	0,70	235	0,265	0,965
52	18.	85,5	609	0,711	224	0,262	0,973
53	18.	89,7	634	0,706	275	0,307	1,013
						Mittelwert	0,958

Von dem Normalwert für ruhende Muskeln (1,09 ± 0,03) weicht dieser Mittelwert um — 0,1% ab.

In den Versuchen, die das Schicksal der Kohlenhydrate während der Muskelerholung klarstellen sollten, reizten wir ganze Hinterschenkelpräparate in dem Apparat *B* unter Wasserstoff bei 6° bis zur Erschöpfung, kühlten die Muskeln ab und entnahmen schnell die Kontrollschenkel; dann wurden die unverletzten Beine in reinem Sauerstoff bei 15° der Erholung überlassen. Nach 6 Stunden — diese Zeit entspricht nach den Versuchen von Fletcher und Hopkins bei 15° dem größten Milchsäureschwund — wurden auch diese Schenkel verarbeitet.

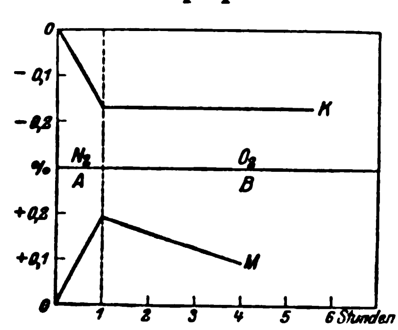


Fig. 3. Kohlenhydratschwund (*K*) und Milchsäurezuwachs (*M*) während der anoxybiotischen Reizung (*A*) und der Erholung in Sauerstoff (*B*). (*M*) nach Versuch 7 von F. und H., (*K*) nach Mittelwerten der Tabellen IX u. XIII.

Tabelle XIII.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
		Ermüdete Muskeln						Muskeln nach Erholung					
Nr.	Datum	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %	Gewicht g	Glykogen mg	Glykogen %	Glucose mg	Glucose %	Summe %
61	5. II.	38,5	226	0,588	109	0,284	0,872	38,9	236	0,607	102	0,263	0,870
62	5.	41,3	245	0,593	95	0,230	0,833	41,6	260	0,625	95	0,229	0,854
63	5.	42,2	236	0,560	94	0,223	0,783	43,7	251	0,575	71	0,161	0,736

Nr.	Differenz 8—14 %
61	+ 0,002
62	− 0,031
63	+ 0,047

Über das Verhalten der anorganischen und organisch gebundenen Phosphorsäure bei den Zustandsänderungen der Muskeln.

Es bestehen mehrere Angaben, nach denen der Gehalt an Phosphorsäure durch andauernde Reizung der Muskeln erhöht wird; sie beruhen auf Versuchen an Kaninchen und an Hunden.

Weyl und Zeittler[1]) bestimmten den gesamten wasserlöslichen Phosphor mit Ausschluß des ätherlöslichen Phosphatidphosphors in frischen und ermüdeten Kaninchenmuskeln und fanden in den ermüdeten eine Zunahme, die im Durchschnitt aus 4 Versuchen 0,043% des Muskelgewichtes betrug. Es sei hier hervorgehoben, daß diese Versuche nicht, wie die Autoren meinten und die Referenten es wiedergeben, eine Zunahme der anorganischen Phosphorsäure, sondern die Zunahme der gesamten, als anorganische und als wasserlösliche in komplexen Verbindungen vorhandenen Phosphorsäure festgestellt haben.

Macleod[2]), der unter der Leitung von M. Siegfried arbeitete, extrahierte frischen Muskelbrei bei 50 bis 60° mit

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 6, 557, 1882.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 535, 1899.

verhältnismäßig kleinen Wassermengen; er bestimmte die anorganische Phosphorsäure nach einem sicher richtige Werte lieferndem Verfahren. Seine Versuche kommen für die Beurteilung der hier behandelten Fragen nicht in Betracht, da die Reizung nicht an isolierten Muskeln vorgenommen worden war; dies kommt schon darin zum Ausdruck, daß die gesamte Phosphormenge in den gereizten Muskeln größer gefunden wurde als in den ruhenden.

O. v. Fürth[1]) fand keinen außerhalb der Fehlergrenzen liegenden Unterschied zwischen den (durch Titration mit Uranylacetat ermittelten) Phosphorgehalt der wässerigen Auszüge frischer und totenstarrer Kaninchenmuskeln.

Alle diese Untersuchungen sind vor der Veröffentlichung von Fletcher und Hopkins ausgeführt worden. In allen sind die Muskeln vor der Verarbeitung fein zerhackt, in den Versuchen von Weyl und Zeittler mit kaltem Alkohol extrahiert worden. Beziehungen zwischen Milchsäurebildung, Veränderungen der phosphorhaltigen Verbindungen, Kohlenhydratschwund und den Zustandsänderungen der Muskeln lassen sich aus ihnen nicht erschließen.

Die Frage gewann erneutes Interesse, als Embden mitteilte[2]), daß die Milchsäurebildung während der Digestion von Muskelpreßsäften mit der Bildung äquivalenter Mengen anorganischer Phosphorsäure einhergeht. Embden schreibt die Entstehung beider Stoffe der Spaltung einer Glucosediphosphorsäure zu, wie sie während der alkoholischen Gärung aus Zucker entsteht; auch teilte er mit, daß dieser Körper durch Digestion mit Muskelpreßsaft in Milchsäure und Phosphorsäure gespalten wird.

Alle diese Untersuchungen gestatten aus den angeführten Gründen keinen Einblick in die Veränderungen, die die phosphorhaltigen Verbindungen bei Zustandsänderungen des Muskels erfahren; auch Embdens Versuche sind an Preßsäften angestellt worden, in denen die schnell verlaufende Milchsäurebildung vor Beginn des Versuches abgelaufen ist. Wir bestimmten in einigen unserer Versuchsreihen den Gehalt der Muskeln an gesamtem wasserlöslichen und an anorganischem Phos-

[1]) O. v. Fürth, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 3, 561, 1913.
[2]) Verhdl. d. Kongr. f. inn. Med. 1913, 170.

phor; vorwegnehmend wollen wir mitteilen, daß keiner von den Eingriffen, die den Milchsäuregehalt und den Kohlenhydratgehalt der Muskeln verändern, den Gehalt an anorganischen Phosphaten der Muskeln von Rana temporaria beeinflußt.

Die Muskeln werden in der von Fletcher und Hopkins angegebenen Weise durch Zerdrücken unter eiskaltem Alkohol abgetötet, über Null koliert und in das 20fache Gewicht kochenden Wassers geworfen. Sie werden etwa 1 Minute lang in kräftigem Sieden erhalten, um alle Fermente, die komplexe Phosphorsäuren spalten könnten, unwirksam zu machen; dann sofort mitsamt dem wässerigen Auszug in Eis abgekühlt und mit Salzsäure auf den Gehalt von 0,25 % HCl gebracht. So lassen wir die Muskelfasern einen Tag lang bei 0° stehen; sie quellen auf, werden durchsichtig und strukturlos: die Aufquellung gibt die Gewähr, daß ein Diffusionsaustausch zwischen den Fasern und der Flüssigkeit stattgefunden hat. Das Material wird nun abkoliert, in der Reibschale nochmals verrieben — die Muskelfasern zerfallen vollständig — und noch 2mal mit der 10fachen Menge angesäuerten Wassers unter Verreiben kalt ausgezogen. Der alkoholische Auszug der Muskeln wird mit Wasser versetzt, schwach angesäuert und bei vermindertem Druck oder im Luftstrom abdestilliert, der wässerige Rückstand mit den wässerigen Auszügen vereinigt, mit Talcum und wenigen Kubikzentimeter der Schenkschen Enteiweißungsflüssigkeit versetzt, filtriert und mit Schwefelwasserstoff entquecksilbert; wenn das Schwefelquecksilber kolloidal in Lösung bleibt, so wird es mit Rhodankalium koaguliert. Die klare filtrierte Lösung wird mit so viel Ammoniak und Ammonacetat versetzt, daß sie nicht mehr auf Kongo sauer reagiert, wohl aber blaues Lackmus rötet; dann auf das Volumen von etwa 200 ccm verdampft, nochmals filtriert, auf 250 aufgefüllt und ein Teil für eine Neumannsche Bestimmung des Gesamtphosphors, der größere für die Bestimmung des anorganischen Phosphors benutzt.

Wir fällten die Phosphorsäure, wie Macleod[1]), dreimal: zuerst mit Chlorcalcium in schwach ammoniakalischer Lösung, dann nach Auflösung dieses Niederschlages in Salpetersäure mit Ammonmolybdat, und führten schließlich den Phosphor-

---

[1]) l. c.

molybdatniederschlag in Magnesiumammoniumphosphat über, das als Pyrophosphat im Gooch-Neubauer-Tiegel bestimmt wurde. Der Muskel kann komplexe Phosphorsäuren enthalten, deren Spaltbarkeit und Fällbarkeit wir nicht übersehen können; deshalb kombinierten wir die verschiedenen Fällungsmethoden und wählten diejenige, die den kleinsten Phosphorsäurewert lieferte, überzeugten uns aber davon, daß diese Methode bei Anwendung auf rein organische Phosphatlösungen die gleichen Werte liefert, wie die direkte Fällung mit Magnesiamixtur.

Ein Muskelauszug wurde in 4 Portionen geteilt; es wurde in einer der Phosphor nach Neumann bestimmt; die anderen 3 ergaben bei nacheinanderfolgender Fällung

1. mit Molybdat—Magnesiamixtur . 0,0358 g $Mg_2P_2O_7$; 9,9 mg P
2. „ Magnesiamixtur—Molybdat—Magnesiamixtur . . . . . . 0,0329 g $Mg_2P_2O_7$; 9,0 mg P
3. „ Chlorcalcium—Molybdat—Magnesiamixtur . . . . . . 0,0269 g $Mg_2P_2O_7$; 7,5 mg P
4. nach Neumann (Gesamtphosphor) 13,2 mg P

Eine Lösung von Natriumphosphat ergab bei Fällung mit:

a) Magnesiamixtur—Molybdat—Magnesiamixtur . 0,0293 g $Mg_2P_2O_7$
b) Chlorcalcium—Molybdat—Magnesiamixtur . . 0,0289 g $Mg_2P_2O_7$

Durch diese Versuche ist die Anwendung der von uns gewählten Fällungsmethode experimentell gerechtfertigt.

Versuche.

Aus Gruppen von je 6 Temporarien wurden in der Kälte Hinterschenkelpräparate angefertigt; die einen Schenkel wurden sofort nach Fletcher und Hopkins verarbeitet, von den zugehörigen anderen Schenkeln die Muskeln vorsichtig abgeschnitten. Diese Muskeln kamen in große Probiergläser und wurden in einem Thermostaten 35 Minuten auf 43° erwärmt (die Temperatur wurde im Inneren der Gläser gemessen). Die durch Wärmestarre veränderten, wie gekocht aussehenden Muskeln wurden sofort unter eiskaltem Alkohol zerdrückt; der Gesamtphosphor wurde jedesmal in einem Viertel, der anorganische Phosphor in der Hälfte der vereinigten Auszüge bestimmt.

Aus der Tabelle XIV sehen wir, daß der anorganische Phosphor der wärmestarren Muskeln gegen den der frischen nicht differiert; dagegen ist der gesamte Phosphorgehalt der wässerigen Auszüge um ein geringes erhöht.

Tabelle XIV.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	
		Frische Muskeln			Wärmestarre Muskeln			Differenz	
Nr.	Datum	Gewicht g	Gesamt-P %	Anorgan. P %	Gewicht g	Gesamt-P %	Anorgan. P %	8—5	7—4
66	26. I.	18,45	0,191	0,124	18,10	0,205	0,129	+ 0,005	+ 0,015
67	26.	20,85	0,164	0,114	21,30	—	0,117	+ 0,003	—
68	26.	18,80	0,178	0,113	18,70	0,190	0,104	— 0,010	+ 0,012
69	26.	18,65	0,183	0,123	18,65	0,184	0,126	+ 0,003	+ 0,001
70	26.	18,50	0,187	0,112	17,90	0,199	0,120	+ 0,008	+ 0,012
Mittelwert:			0,180	0,117		0,194	0,119	+ 0,002	+ 0,014

Mit den Werten der frischen Muskeln können wir die Werte vergleichen, die wir gleichzeitig an mechanisch zerstörten Muskeln ermittelt haben, die verschiedene Zeiten bei 15° gehalten wurden.

Tabelle XV.

1	2	3	4	5	6	7	
Nr.	Datum	Dauer	Gewicht g	Gesamt-P %	Anorgan. P %	Differenz gegen Mittelwert aus Tab. XIV	
						Anorgan. P	Gesamt-P
71	26. I.	Sofort	23,4	0,181	0,116	— 0,001	+ 0,001
72	26.	13h 45′	27,8	0,166	0,113	— 0,004	— 0,014

Auch hier, wo im Versuch 71 das physiologische Milchsäuremaximum, im Versuch 72 das Säurebildungsmaximum erreicht wurde, zeigt sich keine Veränderung im Gehalt an anorganischem Phosphor.

Wir haben in Versuchsreihen, die wir im Monat November ausgeführt haben, und bei denen dieselbe Methode der Extraktion und Bestimmung mit der einzigen Abänderung angewandt wurde, daß die Klärung der wässerigen Auszüge mit Talcum ohne Quecksilbersalze erfolgte, andere absolute Werte für den Phosphorgehalt der Muskeln gefunden als in denjenigen, die gegen Ende Januar angestellt wurden. Wir fanden damals für normale ruhende Muskeln 0,065% und 0,062% anorganischen Phosphor, für Muskeln, die 20 Stunden bei 12° in Stickstoff gehalten worden sind, 0,066 und 0,066%, für wärmestarre Muskeln 0,075%. Bei Muskeln, die bei Sauerstoffausschluß

bis zur Erschöpfung gereizt worden waren, fanden wir 0,082 % P. Die Gesamtphosphorwerte der wässerigen Auszüge lagen in diesen Versuchen bei etwa 0,1 %. Wir finden hier also kleine Zunahmen des anorganischen Phosphors, die indessen hinter denjenigen, die der entsprechend gebildeten Milchsäure äquivalent wären, weit zurückstehen. Diese Versuche sind aber untereinander nicht in dem Grade vergleichbar wie die in den Tabellen XIV und XV zusammengestellten, in denen stets zusammengehörige Muskeln symmetrischer Extremitäten miteinander verglichen werden.

Was nun die Erscheinung anbetrifft, daß die Muskeln in verschiedenen Monaten verschiedenen Phosphorgehalt zeigen, so vermuten wir, daß sie mit der Periodizität des Stoffwechsels der Frösche zusammenhängt; bevor nicht weitere Versuche im Laufe des Jahres näheren Aufschluß darüber gegeben haben werden, wollen wir auf diese Frage nicht weiter eingehen.

Anhang: Verhalten des Aminostickstoffs bei den Zustandsänderungen der Muskeln.

Wir haben in einigen wässerigen Muskelauszügen, die für die Phosphorbestimmungen — ohne Klärung mit Quecksilbersalzen — angefertigt waren, den Aminostickstoff nach der Methode von van Slyke bestimmt. Die Werte, die wir für normale ruhende Froschmuskeln im Monat November gefunden haben, lagen bei 0,07 bis 0,08 % N, bezogen auf das Muskelgewicht; dieselben Werte wurden für Muskeln gefunden, die 22 Stunden bei 12° unter Stickstoff gehalten waren, ebenso für wärmestarre Muskeln und für solche, die unter Stickstoff bis zur Ermüdung gereizt worden waren.

Diese Werte können nicht dem Kreatin entsprechen; das Kreatin gibt bei Anwendung der van Slykeschen Methode in 15 Minuten etwa 90 % seines Aminostickstoffs ab (9,4 % seines Gewichts): das würde in unseren Versuchen einem Kreatingehalt von 0,7 bis 0,8 % entsprechen, während Nawrocki[1]) und C. Voit[2]) nur einen Gehalt von etwa 0,3 % angeben. Jeden-

[1]) Centralbl. f. d. med. Wiss. 1866, Heft 40. Zitiert nach v. Fürth, Ergebnisse d. Physiol. 2, 1, S. 604.

[2]) Zeitschr. f. Biol. 4, 1868.

falls ergeben unsere Versuche die Tatsache, daß eine Abspaltung von Substanzen, die Aminostickstoff enthalten, also Aminosäuren, Harnstoff, Ammoniak, primäre Basen usw., während der Zustandsänderungen des Muskels, die mit Milchsäurebildung einhergehen, nicht stattfindet.

Besprechung der Ergebnisse.

Wir wollen jetzt die experimentellen Ergebnisse unserer Untersuchung kurz zusammenfassen, bevor wir sie einer eingehenderen Diskussion unterwerfen und Schlußfolgerungen aus ihnen ziehen.

1. Wir haben an isolierten Muskeln von Rana temporaria gefunden, daß mechanische Verletzungen, die eine rasch verlaufende Milchsäurebildung hervorrufen, den Kohlenhydratgehalt dieser Muskeln nicht beeinflussen. In dem Muskelbrei folgt der Kohlenhydratschwund der Milchsäurebildung langsam nach. (Tab. III und Fig. 1.)

2. Bei Vorgängen, die zu einer langsamer verlaufenden Milchsäureanhäufung Anlaß geben, bei Ermüdung der isolierten Muskeln durch Reizung, Abtötung durch Wärme, Chloroform, sowie beim Eintreten der natürlichen Starre findet eine Abnahme der Kohlenhydrate des Muskels statt, die von ähnlicher Größe ist wie die gleichzeitige Milchsäurebildung. (Tab. IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI.)

3. Während der Vorgänge, die zur Erholung der ermüdeten Muskeln in Sauerstoffatmosphäre führen, findet weder Abnahme noch Zunahme der Kohlenhydrate statt (Tab. XIII, Fig. 3).

4. Es ließen sich keine Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen Milchsäurebildung und Kohlenhydratschwund einerseits, der Entstehung anorganischer Phosphorsäure andererseits finden (Tab. XIV, XV).

5. Während der Vorgänge, in denen Milchsäure entsteht, wird keine wasserlösliche, Aminostickstoff enthaltende Substanz abgespalten.

Die Tatsachen, die in den ersten zwei Sätzen zusammengefaßt sind, ergeben, daß **der Muskel bei seiner Tätigkeit und beim Absterben Kohlenhydrate zersetzt, daß diese Zersetzung in den meisten Fällen der Milchsäurebildung parallel geht, unter bestimmten Umständen aber von der Milchsäurebildung zu trennen ist; denn es gibt Bedingungen, unter denen die Kohlenhydratzersetzung hinter der Milchsäurebildung zeitlich zurückbleibt.**

Daraus ergibt sich, daß **in den Muskeln eine Substanz enthalten ist**, die, obgleich **kein Kohlenhydrat**, weder ein einfaches noch ein Polysaccharid, unter der Einwirkung von Reizen, mechanischer Verletzung und Giften in Milchsäure umgewandelt wird. Ferner wird durch unsere Versuche die Annahme nahegelegt, daß **diese Vorstufe der Milchsäure aus den Kohlenhydraten der Muskeln entsteht, denn der Kohlenhydratschwund geht in den meisten Fällen der Milchsäurebildung parallel und folgt ihr, im Fall er zunächst zeitlich hinter ihr zurückbleibt, doch nach.** Die Wahrscheinlichkeit dieses Schlusses reicht so weit, als überhaupt aus dem quantitativ parallelen Verlauf der Entstehung eines Körpers und des Verschwindens eines zweiten in einem chemisch nicht zu übersehenden System auf einen genetischen Zusammenhang beider Körper geschlossen werden darf. Aus der zeitlichen Verschiebbarkeit der Milchsäurebildung und des Kohlenhydratschwundes ergibt sich aber dann die Folgerung, daß die Milchsäure mit einer unbekannten Vorstufe, diese Vorstufe aber mit den Kohlenhydraten genetisch zusammenhängt.

Diese Folgerungen enthalten eine Voraussetzung, die wir näher begründen müssen. Wir setzen die Vorgänge, die nach der mechanischen Verletzung der Muskeln stattfinden, denjenigen gleich, die in der Tätigkeit und im Absterben vor sich gehen: man könnte aber auch annehmen, daß es sich hier um verschiedene Prozesse handelt, daß die Milchsäure, die bei der Zerkleinerung der Muskeln entsteht, einer anderen Quelle entstammt, als diejenige, welche die Muskeltätigkeit begleitet. Folgende Gründe sprechen für die Auffassung, nach der die **Reaktion**, die zur Milchsäureentstehung bei

Zerkleinerung der Muskeln führt, dieselbe ist wie diejenige, in der die Milchsäure langsamer bei Muskeltätigkeit entsteht.

Die Versuche von Fletcher und Hopkins haben gezeigt, daß die Milchsäurebildung in Froschmuskeln in zwei deutlich unterscheidbaren Etappen verläuft; durch Reizung bis zur Ermüdnng kann der Milchsäuregehalt bis auf etwa $0,2\,^{0}/_{0}$ gebracht werden, darüber hinaus geht er nur unter Absterbeerscheinungen. Die Kurve der Milchsäurebildung hat bei diesem Punkt einen Knick, dem eine bedeutende Verlangsamung dieses Vorganges folgt. Denselben Knick zeigt die Kurve der Milchsäurebildung nach der Zerkleinerung des Muskelgewebes: bis zu dem Gehalt von $0,2\,^{0}/_{0}$ erfolgt die Milchsäurebildung fast augenblicklich, sie verläuft dann bis zum Plateau, das dem höchsten Milchsäuregehalt des Muskels entspricht ($0,4\,^{0}/_{0}$), verhältnismäßig langsam (Fig. 1 A). Der Verlauf der Milchsäurebildung im zerkleinerten Muskelgewebe gestaltet sich ähnlich, wie der Verlauf während der Tätigkeit bis zur Ermüdung und dem darauffolgenden Absterben, nur ist er dort zeitlich eng zusammengedrängt: die Hauptpunkte sind dieselben, der während der Muskeltätigkeit langsam entstandenen Milchsäuremenge entspricht die während der Zerkleinerung sofort entstandene, in den späteren Phasen des Vorgangs wird das Plateau des höchsten Milchsäuregehaltes im Muskelbrei viel schneller erreicht, als im intakten, absterbenden Muskel; die Höhe des Plateaus aber ist dieselbe.

Die Reaktion, in der bei Zerkleinerung des Muskelgewebes die Milchsäure entsteht, verläuft sehr schnell, unvergleichlich schneller als diejenige, in der die Milchsäure beim Absterben, bei der Autolyse usw. entsteht; wir wissen nicht, was die Ursache davon ist, ob die Reaktion, oder nur die Konzentrationsverhältnisse anders sind; vielleicht verläuft die Reaktion in dem einen Fall in angehäuftem, im anderen Fall in langsam sich bildendem Material. Betrachten wir aber die Vorgänge bei der Muskeltätigkeit, so müssen wir annehmen, daß auch hier die Reaktion, durch die die Milchsäure entsteht, einen außerordentlich schnellen Verlauf nimmt; sie vollzieht sich hier aber in sehr kurzen Etappen, deren Dauer und Periodizität besonderen Gesetzen unterworfen

sind[1]); aber die Summe der in allen Einzelprozessen gebildeten Milchsäuremengen ist dieselbe, wie bei dem ungeordneten Vorgang, der durch Zerkleinerung des Muskelgewebes eingeleitet wird.

Wir halten deshalb beide Vorgänge, die Milchsäurebildung nach Verletzung und die im tätigen Muskel erfolgende, für chemisch gleichartig, der Unterschied im Ablauf beider Prozesse mag vielleicht demjenigen zwischen dem Abbrennen eines Pulverhaufens und einer Pulverstrecke gleichen.

Nach der Feststellung des Zusammenhanges zwischen der Milchsäurebildung und Kohlenhydratspaltung im Muskel wollen wir einige Untersuchungen besprechen, aus denen sich wichtige Beiträge zu dieser Frage ergeben haben. Es sollen hier nicht mehr diejenigen Arbeiten besprochen werden, die bereits eingangs erwähnt worden sind und die direkt auf diese Frage ausgingen, aber infolge von methodischen Unzulänglichkeiten keine Aufschlüsse geliefert haben, die wir heute noch anerkennen könnten; wir wollen uns mit den Arbeiten beschäftigen, die in der letzten Zeit bei Behandlung anderer Fragen der Muskelphysiologie und Chemie wichtige Hinweise auf die Zusammenhänge der chemischen Vorgänge im Muskel gegeben haben und die Beziehungen zwischen jenen und unseren Ergebnissen betrachten.

1. Unter den Versuchen von Fletcher und Hopkins befindet sich ein ungemein fesselnder, der, ohne eine direkte Aufklärung über den Ursprung der Milchsäure und deren Schicksal im Muskel zu liefern, einen Ausblick auf die Möglichkeiten eröffnet, die man ins Auge fassen muß. Die isolierten Muskeln wurden abwechselnd gereizt und der Erholung im Sauerstoff überlassen; dieser Vorgang wurde 9 mal wiederholt, durch immer wieder entnommene Kontrollen wurde der Milchsäuregehalt nach den Ermüdungs- und den Erholungsperioden ermittelt. Am Ende der ganzen Versuchsreihe wurde eine Gruppe von Schenkeln in Wärmestarre versetzt; der Milchsäuregehalt der wärmestarren Muskeln betrug ebenso 0,4 % wie derjenige, der in ganz frischen, zu Beginn des Versuches in Wärmestarre versetzten Muskeln gefunden wurde.

---

[1]) Siehe die interessanten Ausführungen von R. G. Mines, in denen die Summation der Muskelzuckungen von chemischen Gesichtspunkten aus betrachtet wird. Journ. of Physiol. 46, 1913.

In den Erholungsperioden des Versuches von Fletcher und Hopkins wurden insgesamt 0,338 % des Muskelgewichtes an Milchsäure zum Verschwinden gebracht; trotzdem war der Muskel imstande, dieselbe maximale Milchsäuremenge während der Wärmestarre zu bilden, wie ein frischer Muskel, dessen Fähigkeit, Milchsäure zu bilden, im Versuch noch gar nicht beansprucht worden war.

Fletcher und Hopkins erörterten die Möglichkeiten, diesen Versuch zu deuten, und erkannten, daß hier eine Entscheidung nicht möglich ist. Denn man kann annehmen, daß die Milchsäure, die sich bei der Wärmestarre bildet, einer anderen Quelle entstammt, als die während der Tätigkeit des Muskels gebildete; man kann auch annehmen, daß während der Erholung die Vorstufe der Milchsäure durch Oxydation aus einem Reservestoff des Muskels neu gebildet wird und daß zugleich die Milchsäure oxydativ beseitigt wird. Schließlich kann man sich auch vorstellen, daß während der Erholung aus der Milchsaure die Vorstufe wieder aufgebaut wird[1]).

Auf Grund der Tatsachen, die wir gefunden haben, möchten wir den Versuch von Fletcher und Hopkins in einem Sinne deuten, der sich mit der in zweiter Linie genannten Erklärung dieser Forscher berührt. Uns scheint die Annahme, daß die Vorstufe der Milchsäure unter Oxydation aus Reservestoffen gebildet wird, nicht nötig zu sein; die Kohlenhydrate verschwinden bei Muskeltätigkeit auch unter anaeroben Bedingungen, werden aber andererseits während der Erholung der Muskeln im Sauerstoff nicht angegriffen. Wir stellen uns deshalb den Vorgang folgendermaßen vor: die Vorstufe der Milchsäure wird aus den Reservekohlenhydraten gebildet; die Menge, in welcher sie im Muskel aufgestapelt sein kann, ist begrenzt, sei es durch die

[1]) In letzter Zeit hat sich Höber im Sinne dieser letztgenannten Auffassung ausgesprochen. Er denkt sich die Vorgänge im Muskel so, daß die Vorstufe der Milchsäure während der Muskeltätigkeit in Milchsäure verwandelt wird und die Milchsäure während der Erholung in die Vorstufe: dieser letzte Vorgang soll mit den Oxydationsvorgängen, die sich im Muskel abspielen, „gekoppelt" sein, diese sollen die Energie für die Rückumwandlung der Milchsäure liefern. Uns erscheint gerade diese Erklärung am wenigsten annehmbar. Doch kann an dieser Stelle auf eine eingehende Erörterung nicht eingegangen werden. Zeitschr. f. Elektrochemie 19, 740, 1913.

Menge einer Komponente dieses Stoffes, die zur Verfügung steht, sei es durch eine Selbsthemmung der Reaktion, in der sie aus den Kohlenhydraten entsteht. Andererseits ist es denkbar, daß im Muskel eine Selbsthemmung der Milchsäurebildung durch die Säuerung stattfindet, wie sie Embden und Kondo für die Milchsäurebildung im Muskelpreßsaft nachgewiesen haben[2]): diese würde dann das Milchsäuremaximum des abgestorbenen Muskels, vielleicht auch das physiologische Maximum, bestimmen. Die Entstehung der Milchsäure würde die Neubildung der Milchsäurevorstufe ermöglichen, die oxydative Überführung der Milchsäure in weniger saure Körper die Neubildung der Milchsäure aus der Vorstufe; somit wäre der Ablauf aller dieser Prozesse möglich, solange Kohlenhydrate im Muskel vorhanden sind, und in dem Maße, wie die Ansammlung der kritischen Milchsäurekonzentrationen verhindert wird. In dem Versuch von Fletcher und Hopkins sind insgesamt 0,75% des Muskelgewichtes an Milchsäure gebildet worden: da die Muskeln wahrscheinlich 1% Kohlenhydrat enthalten haben und dazu noch etwa 0,2% an unmittelbarer Milchsäurevorstufe, so können ihre Vorräte noch gar nicht erschöpft gewesen sein.

2. Aus calorimetrischen Untersuchungen konnte A. V. Hill[1]) Aufschlüsse über die Vorstufe gewinnen, aus der die Milchsäure im Muskel entsteht. In den Versuchen dieses Forschers wurde die Wärmeentwicklung während der Vorgänge gemessen, die zur Chloroformstarre und Wärmestarre führen; in den Versuchen von R. A. Peters[2]) auch die Wärmemenge, die während der Ermüdung der Muskeln durch tetanische Reizung entwickelt wird. Aus der strengen Parallelität der Milchsäurebildung, Kohlensäureentwicklung und Wärmebildung bei Sauerstoffausschluß konnte Hill auf den innigen Zusammenhang dieser Vorgänge schließen; die Wärmetönung der tödlichen Starren erweist sich aber, wenn man sie zu der gleichzeitig gebildeten Milchsäuremenge in Beziehung setzt, viel größer, als die Wärmemenge, die sich aus thermochemischen Daten der Milchsäurebildung aus Glucose berechnen läßt. In den Petersschen Versuchen bildet der Froschmuskel, wenn er bis zur Ermüdung gereizt wird, 0,9 Cal. pro Gramm Gewebe; wird er in Starre

[1]) Journ. of Physiol.. **44**, 466, 1912, besonders 501ff.

[2]) Journ. of Physiol. **47**, 243ff.

versetzt, so beträgt die Wärmebildung 1,7 Cal. Da die Milchsäurebildung unter den letztgenannten Umständen etwa 4 mg pro Gramm Muskel beträgt, so ergibt sich unter der Voraussetzung, daß sie unter anaeroben Bedingungen der einzige unter erheblicher Wärmeentwicklung im Muskel verlaufende Vorgang ist, für die Entstehung von einem Mol Milchsäure die Wärmetönung von 38 Cal.; aus der Differenz zwischen der Verbrennungswärme der Glucose und derjenigen der Milchsäure ergeben sich aber für das Mol Milchsäure nur etwa 7,5 Cal.

Diese Überlegungen führen Hill zu dem Schluß, daß die Vorstufe der Milchsäure im Muskel nicht ein Kohlenhydrat ist, sondern ein Stoff, dessen Übergang in Milchsäure mit einer höheren Wärmetönung verbunden ist. Uns scheint dieser Schluß auf einer nicht genügend sicheren Prämisse zu beruhen; denn gegen die Sicherheit, welche die Berechnung kleiner Reaktionswärmetönungen aus sehr hohen Verbrennungswärmen bietet, lassen sich Bedenken vorbringen; dabei ist die Verbrennungswärme der Milchsäure nicht direkt bestimmt, sondern aus der des Äthylesters berechnet worden[1]).

Daß solche Differenzrechnungen aber leicht zu Ungenauigkeiten führen können, läßt sich leicht an einem Beispiel zeigen. Nach Stohmanns Messungen[2]) beträgt die Verbrennungswärme der Stärke 4183 Cal. pro Gramm, die der Maltose 3949 Cal.; es müßte also, da aus 1 g Stärke 1,055 g Maltose mit der Verbrennungswärme von 4147 Cal. entsteht, die Wärmetönung der Verzuckerung 36 Cal., also 0,88 % der Verbrennungswärme betragen. Nach Hills[3]) direkter Messung beträgt aber die Wärmetönung der Stärkeverzuckerung durch Speicheldiastase weniger als 0,01 % der Verbrennungswärme.

Rubner[4]) hat bei direkten Bestimmungen der Wärmetönung, die das Sauerwerden der Milch begleitet, viel höhere Werte erhalten, als die aus thermochemischen Daten berechenbaren. Vielleicht ist auch diese Unstimmigkeit eher durch Unsicherheit der thermischen Daten für Milchsäure, als durch Annahme von Nebengärungen zu erklären.

---

[1]) Longuinine, Compt. rend. 107, 597, 1889.

[2]) Journ. of Physiol. 43, 285.

[3]) Zit. nach Landolt und Börnstein, Physik.-chem. Tabellen 1912.

[4]) Arch. f. Hygiene 5, 244, 1906.

Sollten sich die Grundlagen von Hills Schlußfolgerung bestätigen, so wären diese von weittragender Bedeutung[1]).

Die Beziehungen der Kohlenhydrate zu der Vorstufe, aus welcher die Milchsäure im Muskel gebildet wird, geht aus unseren Versuchen hervor; und es ist erwiesen worden, daß die Kohlenhydrate auch unter anaeroben Bedingungen verschwinden. Es ist schwer anzunehmen, daß eine Vorstufe, die mit viel höherer Wärmetönung in Milchsäure übergeht, ohne Abspaltung von Kohlensäure oder Aufnahme von Sauerstoff aus Zucker entstehen sollte; mit Kohlensäurebildung aber ist die Milchsäurebildung unter anaeroben Bedingungen nicht verbunden, dies geht aus Hills[2]) scharfsinniger Betrachtung der Zahlen von Fletcher[3]) hervor. Wenn die Wärmetönung der Milchsäurebildung im Muskel von der Wärmetönung der Milchsäuregärung stark abweicht, dann müßte man annehmen, daß die Kohlenhydrate im Muskel unter anaeroben Bedingungen in eine Vorstufe übergeführt werden, die während der Erholung unter dem Einfluß des Sauerstoffs in eine andere übergeht, die unter höherer Wärmetönung als Zucker in Milchsäure zerfällt.

3. Wir kommen zu denjenigen Untersuchungen, die sich mit der Milchsäurebildung in zerkleinertem Gewebe oder in Preßsäften beschäftigt haben und in denen Versuche gemacht wurden, die Entstehung dieser Substanz durch Kohlenhydrate zu beeinflussen.

Die Untersuchungen, die sich an Cohnheims bekannte Versuche über das Verschwinden von Glucose aus Gemischen von Muskelplasma und Pankreas anschlossen, möchten wir nur kurz streifen. Die Richtigkeit der Beobachtungen von Cohnheim ist in den letzten Jahren zweifellos erwiesen worden, die vermutete Glykolyse hat sich aber als eine Synthese zu Disacchariden herausgestellt[4]): somit hat dieser Vorgang mit der Bildung von Milchsäure aus Kohlenhydraten direkt nichts zu tun. Auch die Versuche von Gigon und Massini[5]), die

---

[1]) Die experimentell unzulängliche Arbeit von Ransom (Journ. of Physiol. 42) sei hier nur erwähnt.

[2]) Journ. of Physiol. 44, 481, 1912.

[3]) Journ. of Physiol. 28, 10ff., 1898.

[4]) S. Levene und Meyer, Journ. of Biolog. Chem. 9, 97, 1911.

[5]) Diese Zeitschr. 55, 189, 1913.

durch geeignete Behandlung der Muskelsubstanz eine viel ausgiebigere „Glykolyse" erreicht haben, als sie je zuvor beobachtet worden ist, lassen noch nicht erkennen, ob es sich dabei um einen Abbau der Kohlenhydrate oder um eine Zusammenfügung zu größeren, schwächer reduzierenden Zuckern handelt.

In der Untersuchung von Fletcher[1]) wurde die Milchsäurebildung in zerkleinerten Kaninchen- und Froschmuskeln studiert; ihre Größe wurde durch Zusatz von Kohlenhydraten nicht beeinflußt. Fletcher hat daraus geschlossen, daß die Milchsäure nicht durch ein „glykolytisches" Ferment erzeugt wird.

Gegen diesen Schluß kann der Einwand erhoben werden, den Zuntz[2]) gegen Ransoms[3]) Versuche am koffeinvergifteten Muskel und die Folgerungen daraus erhoben hat: Eine Vermehrung der Milchsäure durch Zusatz von Kohlenhydraten wäre nur dann zu erwarten, wenn in dem Brei ein Mangel an Kohlenhydraten herrschen würde. Wenn aber der Milchsäurebildung die Eigenschaft zukommt, bei einer bestimmten Säurekonzentration stehenzubleiben, und andererseits genügend Kohlenhydrat und anderer Vorstufe im Muskel vorhanden ist, um diese Konzentrationsgrenze zu erreichen, so ist es nicht notwendig, anzunehmen, daß die Milchsäureproduktion durch Zusatz von Zucker oder Glykogen beeinflußt wird.

Mit ähnlichen Fragen wie die Untersuchungen von Fletcher beschäftigen sich die Untersuchungen von Embden, Kalberlah und Engel[4]) sowie die unter Embdens Leitung ausgeführte Arbeit von H. Kondo[5]). Die Versuche dieser Forscher wurden an Preßsäften aus Hundemuskeln angestellt; es wurde gefunden, daß in solchen Preßsäften, die schon zu Beginn der Versuche viel Milchsäure enthielten, bei 40° der Milchsäuregehalt zunimmt; die Zunahme beträgt 0,041 bis 0,33% des Preßsaftgewichts, 5 bis 120% der ursprünglich vorhandenen Milchsäuremenge. Die Autoren geben an, daß die Preßsäfte weder Glykogen noch meßbare Mengen Traubenzucker ent-

[1]) Journ. of Physiol. 43, 286, 1911.
[2]) Oppenheimers Handb. d. Biochem. 4, 2.
[3]) l. c.
[4]) Diese Zeitschr. 45, 45 ff.
[5]) Ebenda 45, 63 ff.

hielten; Versuche, durch Zusatz von Traubenzucker die Milchsäurebildung zu beeinflussen, führten fast niemals zu einer deutlichen Vermehrung, in einigen Fällen zu einer sehr starken Herabsetzung der gebildeten Milchsäuremenge (Kondos Versuch 12 F, 16 F).

Näheres über die Kohlenhydratbestimmungen in den Preßsäften haben Embden und seine Mitarbeiter leider nicht mitgeteilt; insbesondere haben sie anscheinend nicht untersucht, ob nicht durch Inversion bestimmbare Kohlenhydrate darin enthalten waren.

Und vor kurzer Zeit hat Forschbach[1]) mitgeteilt, daß er in Preßsäften, die genau nach Embdens Angaben aus den Muskeln normaler Hunde hergestellt worden sind, 0,19 % Glucose gefunden hat, eine Menge, die genügt, um die Milchsäurebildung in den Preßsäften zu erklären[2]). Bei einem pankreasdiabetischen Hunde betrug der Zuckergehalt im Preßsaft sogar über 0,3 %.

Wäre diese Unklarheit behoben, so würden die Versuche von Embden und seinen Mitarbeitern beweisen, daß die Milchsäure im Muskelpreßsaft aus einem Stoff entsteht, der kein Kohlenhydrat ist.

Über die physiologische Bedeutung der Milchsäurebildung, die Embden und seine Mitarbeiter im Muskelpreßsaft beobachtet haben, und ebenso über die Beziehungen dieser Milchsäurebildung zu derjenigen, die von Fletcher und Hopkins untersucht haben, läßt sich vorläufig nichts aussagen, was mehr als bloße Vermutung wäre.

Nur die jüngst mitgeteilten Beobachtungen Embdens, nach denen die Milchsäurebildung im Preßsaft unter gleichzeitiger Entstehung äquivalenter Phosphorsäuremengen erfolgt, und die daraus abgeleitete Vorstellung, daß eine Glucosephosphorsäure die Quelle der Milchsäure im Muskel darstellt, möchten wir in diesem Zusammenhang erwähnen. Wir konnten

---

[1]) Ebenda 58, 342, 1913.

[2]) In demjenigen Versuch von Embden, Kalberlah und Engel (Nr. 2, S. 50 und 51), in denen bemerkt wird, daß der Preßsaft nur Spuren reduzierender Substanz enthält, ist auch die geringste Milchsäurevermehrung eingetreten (5 % des Anfangswertes), die wohl in den Fehlergrenzen liegt (vgl. den Versuch 10 von Kondo, l. c. S. 71).

keine Anhaltspunkte dafür gewinnen, daß im intakten oder zerkleinerten Muskel ein Zusammenhang zwischen Milchsäurebildung und Phosphorsäureabspaltung besteht. Die von Embden entwickelte Vorstellung würde in der Tat die Vorgänge im Muskel — insbesondere die Umwandlung des Zuckers in die Milchsäurevorstufe und den Übergang der Vorstufe in Milchsäure, wie wir ihn auf Grund unserer Versuche annehmen — sehr einfach erklären; doch müssen wir uns gegenwärtig halten, daß noch andere Annahmen möglich sind, die an Erklärung dasselbe leisten.

Über den mikroskopischen Nachweis der Eiweißspeicherung in der Leber.

Von

W. Berg.

(Aus dem Anatomischen Institut der Universität zu Straßburg i. E.)

(Eingegangen am 6. März 1914.)

Mit 2 Tafeln.

Es ist längst bekannt, daß nach der Resorption von Eiweiß Organeiweiß angesetzt werden kann; dagegen ist einwandfrei noch nicht nachweisbar gewesen, ob Zwischenstufen zwischen dem resorbierten und dem Organeiweiß auftreten, und ob es Organe gibt, welche die Speicherung solcher Zwischenprodukte besorgen können. Eine derartige Funktion vermutete man allerdings für die Leber bei ihrer dominierenden Stellung im Stoffwechsel.

Z. B. schloß man dies aus Giftwirkungen, die nach Anlegung der Eckschen Fistel[1]) bei Fleischfütterung eintraten, aber ausblieben, wenn die Leber in den Kreislauf eingeschaltet war; sie schien daher eine entgiftende Wirkung auszuüben durch irgendwelche Umwandlung der zugeführten Eiweißverdauungsprodukte. Dagegen haben Versuche von Abderhalden und London[2]) gezeigt, daß für die Giftwirkung die unvollkommene Technik anzuschuldigen war, und bei Fütterung mit tiefabgebautem Eiweiß Stickstoffgleichgewicht auch unter Ausschaltung der Leber durch die Ecksche Fistel auftreten konnte.

Seitz[3]) fand — auf Veranlassung von Pflüger — nach

---

[1]) Fischler, Arch. f. klin. Med. 104.

[2]) E. Abderhalden und E. S. London, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 112, 1907.

[3]) Seitz, Arch. f. d. ges. Physiol. 111, 309.

Fütterung von Kabeljaufleisch bei Hühnern und Enten ein Ansteigen des Lebergewichtes auf das Mehrfache gegenüber dem der Hungertiere; der absolute Stickstoffgehalt stieg dabei auf das 2 bis 4 fache, der prozentuale Gehalt blieb gleich oder war verringert, so daß man aus diesen Resultaten zwar auf Eiweißansatz in der Leber, nicht aber auf Eiweißspeicherung schließen kann. In neuerer Zeit konnte Grund[1]) bei Verfeinerung der chemischen Methoden keinen Anhalt für Speicherung von Zelleinschlußeiweiß in den Muskeln finden; für die Leberzellen ergibt sich aus seinen Versuchen die Möglichkeit von Eiweißspeicherung, doch so, daß nach Grund beträchtliche Mengen von Zelleinschlußeiweiß sicher ausgeschlossen sind.

Da die Strukturen in den gewöhnlichen mikroskopischen Präparaten, die ohne Rücksicht auf die Konservierung von Fett oder Glykogen hergestellt sind, aus Eiweiß bestehen, ist die mikroskopische Methodik auf unsere Fragestellung anwendbar und angewendet worden. Afanasiew[2]) verfütterte auf Veranlassung von R. Heidenhain unter anderem Fibrin an Hunde; er fand die Leberzellen eckig, mit großen Kernen und viel Eiweiß; seine so gewonnenen Bilder unterscheiden sich bezüglich des Protoplasmas nur durch etwas größere Dichte von den mit Kohlenhydratfütterung erhaltenen, so daß man bei dem damaligen Stand der mikroskopischen Technik nicht einmal mit Sicherheit auf Eiweißanreicherung schließen kann. Alice Leonard[3]) fand beim Frosch von der Jahreszeit abhängige Struktur- und Größendifferenzen der Leberzellen und schloß auf Grund der Färbung mit einem Gemisch von Hämatoxylin, Eosin, Nigrosin und Safranin auf Eiweiß- und Glykogenspeicherung. Ihre Methodik scheint zu unsicher, um diesen Schlüssen beistimmen zu können. Asher und Boehm[4]) verfütterten an Ratten Kohlenhydrate, Fette, Fleisch, Albumosen (Witte-Pepton), Alanin und Asparaginsäure und bekamen Struktur- und Größendifferenzen von Kern und Protoplasma, die aber bezüglich Eiweißspeicherung kaum anders zu bewerten sind als die Resultate von Afanasiew.

---

[1]) G. Grund, Zeitschr. f. Biol. 54.
[2]) Afanasiew, Arch. f. d. ges. Physiol. 30, 385, 1885.
[3]) Leonard, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abt., Suppl. 1887.
[4]) Asher und Boehm, Zeitschr. f. Biol. 51, 409.

Die bisher nach Eiweißfütterung erhaltenen Bilder der Leberzellen unterschieden sich nur graduell von den durch Fütterung anderer Nahrungsstoffe erzielten. Dagegen ist es vor einiger Zeit dem Verfasser gelungen, prinzipiell verschiedene und für Eiweißfütterung spezifische Bilder zu erhalten; ermöglicht wurde dies durch Bestrebungen, die angeregt wurden durch den Botaniker Fischer[1]) und fortgeführt wurden durch G. Wetzel[2]), W. Berg[3]) und andere Autoren. Wenn man nämlich Lösungen genuiner Eiweißkörper wie Albumine, Globuline und Casein mit den üblichen Fixationsmitteln fällt, so erhält man Niederschläge, deren Konstituenten außerordentlich kleine, an der Grenze der mikroskopischen Sichtbarkeit stehende Gebilde sind, die, am häufigsten zu Gerüsten oder Netzen angeordnet, aussehen wie der als feinpunktiert so oft beschriebene Zustand des Protoplasmas (Fischer). Dagegen fallen Eiweißspaltprodukte bis hinauf zu den Albumosen und Peptonen in ganz anderer Form, nämlich als distinkte Granula von mindestens bequemer mikroskopischer Sichtbarkeit, sogar oft beträchtlicher Größe; diese Granula haben bisweilen die Eigenschaft, miteinander zu Tropfen zu verfließen. Benutzt man als Fällungsmittel geeignete Kolloide, so erhält man dieselben Bilder, jedoch haben diese durch solche interkolloidale Fällung produzierten Granula eine verstärkte Neigung, zu zähflüssigen Tropfen zu verfließen, wie ich beim Ausfällen von genuinen und gespaltenen Eiweißkörpern mit einer Reihe von Nucleinsäuren, Chondroitinschwefelsäure und außerdem Metaphosphorsäure neuerdings nachweisen konnte.

Da ich auf diesen Ergebnissen fußen konnte, mußten mir eigentümliche, tropfenförmige Gebilde von sehr variabler Form in den Leberzellen gut genährter Tiere, und zwar sowohl von Kaltblütern (Salamander, Triton, Frosch) wie von Warmblütern (besonders untersucht Kaninchen) auffallen, die bei Hungertieren vollkommen fehlten. Man vergleiche Fig. 1 und 2, die diese Einschlüsse in Leberzellen eines gut genährten Salamanders und Kaninchens zeigen, mit Fig. 3 und 4, Leberzellen von Hungertieren. Diese Tropfen erscheinen in gleicher Form nach

[1]) Fischer, Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena 1899.
[2]) Wetzel, Verhdl. d. physiol. Ges. Berlin 1903.
[3]) W. Berg, Arch. f. mikroskop. Anat. 62 u. 65.

Fixation mit Alkohol oder beliebigen wässerigen Fixationsflüssigkeiten, sind unempfindlich gegen tagelanges Auswaschen in fließendem Wasser, gegen beliebig langen Aufenthalt in verdünntem und absolutem Alkohol, sie werden durch Chloroform und Alkoholäther nicht beeinflußt, ebensowenig durch Einbettung in Paraffin oder Celloidin. Sie sind gut färbbar, z. B. leuchtendrot mit Methylgrün-Pyronin; wichtiger ist, daß sie mit Millons Reagens rötlich mit einem Stich ins Mahagonibraune gefärbt werden. Sie sind keine Produkte der Autolyse der Leberzellen, denn neben ihnen lassen sich außer dem gut fixierten Kern und Protoplasma die gegen jenen Vorgang so empfindlichen Mitochondrien aufs eleganteste nachweisen, wie in einer früheren Publikation gezeigt wurde[1]). Zwecks Aufklärung der Natur dieser Tropfen wurden Hungertiere mit Kohlenhydraten oder Fett (säurefreies Olivenöl) gefüttert, ohne daß solche Tropfen auftraten, wie Fig. 5 für Zellen der Kaninchenleber zeigt. Fütterte man jedoch mit Eiweiß (Kaninchen mit Casein, Salamander mit Casein oder Froschmuskulatur), traten identische Tropfen auf, und zwar ohne nachweisbare Veränderung des Protoplasmas; besonders reichlich waren die Tropfen dann, wenn man den gänzlich ausgehungerten Tieren, — die Salamander hatten bis zu $1^1/_2$ Jahren, die Kaninchen 60 Stunden gehungert — neben Eiweiß die an sich unwirksamen Kohlenhydrate reichte. Die Tropfen verschwinden allmählich unter Vakuolisation, bei gut genährten Salamandern erst im Verlaufe einer Hungerperiode von mehreren Wochen. Ihr Verschwinden ließ sich durch Darreichung von Kohlenhydraten verzögern.

Was die Lokalisation dieser Tropfen angeht, so sind sie über die ganze Zelle zerstreut, jedoch findet man häufig Bilder, wie Fig. 1 darstellt, wo man den Eindruck eines Abtropfens dieser Gebilde von den Blutcapillaren in die Zellen hinein auf den Kern zu gewinnen kann; vielfach findet man sie dem Kerne dicht anliegend; jedenfalls ist ihre Verteilung so wechselnd und unregelmäßig, daß sie nicht als Ausdruck von intracellulären Capillaren (Browicz[2]) aufgefaßt werden können.

---

[1]) W. Berg, Anatomischer Anzeiger 42, 1912.

[2]) Browicz, Virchows Archiv 168 enthält eine Zusammenfassung seiner Arbeiten. Anatomischer Anzeiger 22.

Diese Tropfen sind von einer Reihe von Histologen (z. B. Braus[1]), R. Krause[2]), E. Koiransky[3]), Schmaus[4]) und vielleicht auch Carlier[5]) beschrieben, aber im allgemeinen wenig beachtet und jedenfalls in ihrer Bedeutung nicht erkannt worden. Daß diese Gebilde keinen Ausdruck für die Gallensekretion darstellen, ließ sich am Hungersalamander durch Behandlung mit ölsauren oder gallensauren Salzen zeigen; in den Leberzellen dieser Tiere ließen sich, wie an anderer Stelle ausführlich geschildert werden soll, die an sezernierenden Speicheldrüsenzellen bekannten Phänomen nachweisen. Es kommt dabei zu Strukturveränderungen des Zellprotoplasmas, während solche bei dem Auftreten der beschriebenen unregelmäßigen Tropfen nach Eiweißfütterung nicht zu erkennen waren. Dies scheint für die Bewertung des Vorganges von wesentlicher Bedeutung zu sein.

Zusammenfassend kann man also sagen:

Es finden sich in den Leberzellen gut genährter Tiere in reichlicher Menge Tropfen, die bei Hungertieren vollkommen fehlen, und die durch Eiweißfütterung, nicht aber durch Kohlenhydrat- oder Fettfütterung hervorzurufen sind. Diese Tropfen erweisen sich mit Wahrscheinlichkeit schon durch ihr Verhalten gegenüber den histologischen Prozeduren, mit Sicherheit durch den positiven Ausfall der Millonschen Reaktion, als Eiweiß. Dieses unterscheidet sich von demjenigen des Protoplasmas prinzipiell durch sein morphologisches Verhalten im Sinne der vorher erwähnten Fällungserscheinungen. Dabei besteht eine Analogie von fixiertem Protoplasma mit genuinem Eiweiß, von diesen Tropfen mit Niederschlägen abgebauten Eiweißes, wie sie durch interkolloidale Fällung erhalten werden.

Diese morphologischen Befunde habe ich a. O.[6]) schon früher publiziert, sie enthalten den Nachweis, daß nach Eiweißfütterung in den Leberzellen Eiweiß in einer Form auftritt,

---

[1]) Braus, Jenaer Denkschriften 5.

[2]) R. Krause, Arch. f. mikr. Anatomie 42.

[3]) Koiransky, Anatomischer Anzeiger 25.

[4]) Schmaus Festschrift zu Kupffers 70. Geburtstag. Jena 1899.

[5]) Carlier, La cellule 22.

[6]) W. Berg, l. c. und Münch. med. Wochenschr. 1913, Heft 2. Sitzungsber. d. naturwissenschaftl.-med. Vereins zu Straßburg.

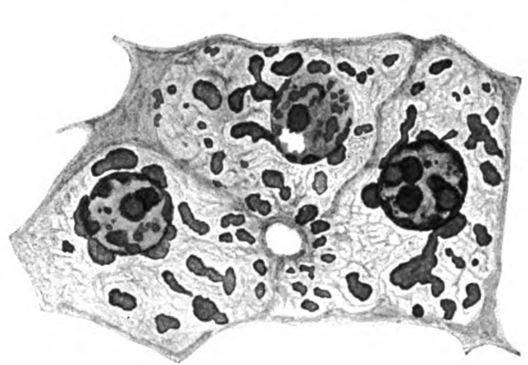


Fig. 1a.

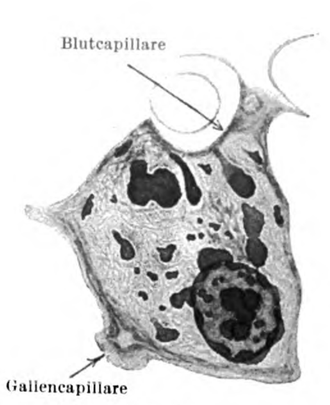


Fig. 1b.

Fig. 1a und 1b. Leberzellen eines gut genährten Salamanders. Vergrößerung: 750. Färbung: Methylgrün-Pyronin.

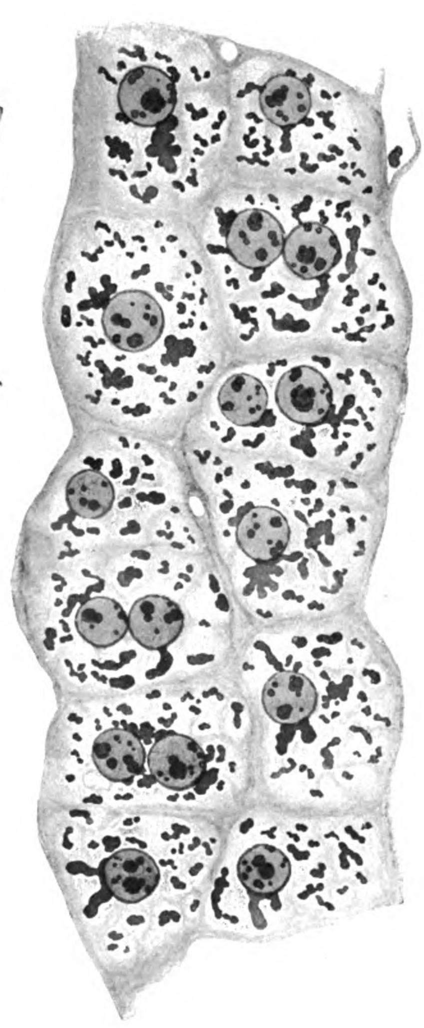


Fig. 2.
Leberzellen eines gut genährten Kaninchens. Vergrößerung: 1000. Färbung: Methylgrün-Pyronin.

Verlag von Julius Springer in Berlin.



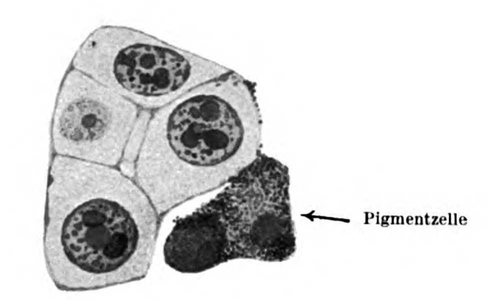
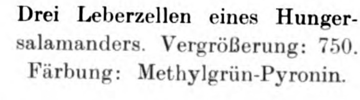


Fig. 3.



Drei Leberzellen eines Hungersalamanders. Vergrößerung: 750. Färbung: Methylgrün-Pyronin.



Fig. 4.
Leberzellen eines Hungerkaninchens. Vergrößerung: 1000. Färbung: Methylgrün-Pyronin.

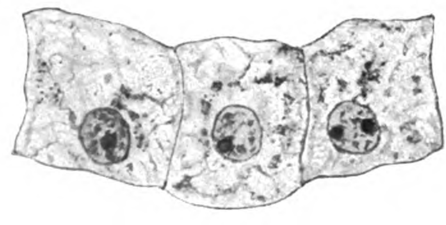


Fig. 5.
Drei Leberzellen eines Kohlenhydratkaninchens. Vergrößerung: 1000. Färbung: Methylgrün-Pyronin.



die vom Protoplasma different ist; sie gestatten damit von einer Eiweißspeicherung in der Leber, von Zelleinschlußeiweiß, zu sprechen.

In allerneuestes Zeit haben diese Befunde eine erfreuliche Bestätigung und Ergänzung, durch die Untersuchungen von Tichmeneff[1]) gefunden: Er fand, daß bei Mäusen, die 2 Tage gehungert hatten, nach Eiweißfütterung der Stickstoffgehalt der Leber stark ansteigt und daß sich dabei das Verhältnis von Stickstoff zu Phosphor in der Leber zugunsten des Stickstoffes verschiebt. Zur Entscheidung der Frage, ob es sich dabei um Eiweißansatz oder Eiweißspeicherung handelt, fordert er, daß das abgelagerte Eiweiß nicht in die Organisation des Protoplasmas eingeht, oder daß es chemisch von den Eiweißkörpern der Leberzellen verschieden sei. Diesen Forderungen scheinen mir meine Resultate zu genügen.

---

[1]) N. Tichmeneff, diese Zeitschr. 59, 1914.

Über den mikroskopischen Nachweis der Eiweißspeicherung in der Leber nach Verfütterung von Aminosäuren.

Von

W. Berg und C. Cahn-Bronner.

(Aus dem Anatomischen Institut der Universität zu Straßburg i. E.)

(Eingegangen am 6. März 1914.)

Mit 1 Tafel.

Auf Grund passender Anwendung der histologischen Methodik gelang es W. Berg, die Eiweißspeicherung in der Leber[1]), in der physiologischen Literatur ein Gegenstand häufiger Diskussionen, nachzuweisen und morphologisch zur Anschauung zu bringen. Es lag nahe, mit derselben Methodik eine weitere Frage zu bearbeiten, nämlich wie tief abgebaut das Eiweiß sein darf, um noch eine Eiweißspeicherung in der Leber hervorzurufen.

Das Problem, das Eiweiß der Nahrung durch vollständig abgebautes Eiweiß zu ersetzen, ist von O. Loewi[2]) gestellt und im Prinzip auch gelöst worden. Durch die Untersuchungen von Abderhalden[3]) und seinen Mitarbeitern wurde es sichergestellt; sie konnten zeigen, daß Hunde sich im Stickstoffgleichgewicht hielten, daß sogar Stickstoffretentionen eintreten konnten, wenn man statt genuinem Eiweiß Gemische von Eiweißspaltprodukten als einzige stickstoffhaltige Nahrung fütterte. Als solche benutzten sie fermentativ bis auf die Aminosäuren und durch Säurehydrolyse ebensoweit abgebautes Ei-

---

[1]) W. Berg, Anat. Anzeiger 42, 1912; Münch. med. Wochenschr. 1913, Heft 2; Sitzungsber. d. med.-naturwissensch. Vereins zu Straßburg; diese Zeitschr. 61, 428, 1914.

[2]) O. Loewi, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 48.

[3]) Abderhalden und Mitarbeiter, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42 bis 68, 1904 bis 10.

weiß; weitaus am besten eignen sich die fermentativ gespaltenen Eiweißkörper, mit diesen gelang es einen Versuch auf 74 Tage[1]) auszudehnen, — mit den durch Säure hydrolysierten gelingt es ungleich schwerer. Differenzen zwischen den Resultaten von Abderhalden einerseits und Henriques und Hansen[2]) andererseits, welch letzteren es nicht gelang, mit einem durch Säurehydrolyse erhaltenen Gemisch Stickstoffgleichgewicht zu erreichen, klärten sich dahin auf, daß bei der Säurehydrolyse das Tryptophan, das im tierischen Organismus nicht gebildet werden kann, stark verändert wird, somit diese Differenzen bezüglich der Vertretbarkeit des Eiweißes durch seine Spaltprodukte nicht prinzipiell sind. Zuletzt glückte es Abderhalden[3]), auch mit einem Gemisch von 16 künstlichen Aminosäuren 6 und 8 Tage lang Stickstoffgleichgewicht und auch Stickstoffretentionen zu erzielen, so daß er von der Lösung des Problems der künstlichen Darstellung der Nahrungsstoffe sprechen kann. Weiterhin gelang es Franz Frank und Alfred Schittenhelm[4]) nachzuweisen, daß vollständig abgebautes Eiweiß sogar quantitativ für natives Eiweiß eintreten kann, d. h. daß sich beidemal das gleiche Stickstoffminimum einhalten läßt. Mit einem Präparat, Erepton, das die Höchster Farbwerke nach Angaben von Abderhalden darstellen und in den Handel bringen und das ein solches fermentativ gewonnenes Aminosäurengemisch darstellt, dehnten die beiden letztgenannten Autoren[5]) ihre Versuche auch auf den Menschen erfolgreich aus.

Nachdem so gezeigt war, daß die Fütterung von Eiweiß und Eiweißabbauprodukten zu einem gleichen Zustand führen kann, erhob sich die Frage, ob dieser auch auf dem gleichen Wege erreicht worden ist. Ist man mit Abderhalden der Auffassung, daß das Nahrungseiweiß im Darm vollständig zu den Aminosäuren abgebaut wird und nur vollständig aufgespalten zur Resorption gelangt, so ist es im Prinzip als gleich

---

[1]) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**.

[2]) Henriques u. Hansen, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**, **48**, **54**.

[3]) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**.

[4]) Franz Frank u. Alfred Schittenhelm, Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**.

[5]) Franz Frank u. Alfred Schittenhelm, Therap. Monatsh. **1911**, 415.

zu erachten, ob man Eiweiß oder seine Spaltprodukte darreicht. Doch lassen sich einige Tatsachen anführen, die auf eine verschiedene Arbeitsleistung des Organismus und übereinstimmend auf Verschiedenheiten der Leberfunktionen bei Fütterung von Eiweiß und Eiweißabbauprodukten schließen lassen. Von den Resultaten, die man unter diesem Gesichtspunkt betrachten kann, seien kurz folgende angeführt. Asher und Barbéra[1]) gaben intravenös Pepton und beobachteten eine verstärkte Gallenproduktion. Starling[2]) fand nach Peptoninjektion eine Zunahme der aus der Leber ablaufenden Lymphe. Da nun nach Barbéra auf Grund anderer Untersuchungen[3]) die ausgeschiedene Galle ein Maß für die Intensität der Stoffwechselvorgänge in der Leber darstellt und wir gewohnt sind auch die Lymphbildung in einem Organ unter ähnlichem Gesichtspunkt zu betrachten, so könnte man diesen Beobachtungen einen Hinweis auf eine gesteigerte, jedenfalls andersartige Arbeitsleistung der Leber nach Darreichung von Eiweißabbauprodukten gegen die normale entnehmen. Es liegen weitere Arbeiten vor, bei denen die Eiweißspaltprodukte verfüttert und nicht injiziert wurden. Nolf und Honoré[4]) handen, daß Albumosen und Peptone nach Aufnahme größerer Mengen den Darm als solche passieren und in die Leber gelangen, Resultate, die durch die Untersuchungen Messerlis[5]) bezüglich der Resorptionsgeschwindigkeit der Eiweißabbauprodukte gestützt werden. Weiterhin fand Pletnew[6]) bei Fütterung von Eiweißspaltprodukten die Zuckerassimilationsgrenze stark herabgesetzt, was er auf eine Arbeitsteilung der Leber zwischen Zuckerassimilation und Verarbeitung der Eiweißabbauprodukte deutete; daß die Leber hierbei irgendeiner Reizwirkung zu unterliegen scheint, geht daraus hervor, daß Gallenfarbstoff im Harn auftrat und eine Zuckerausscheidung

---

[1]) Asher u. Barbéra, Zeitschr. f. Biol. 18, 1897; vgl. dagegen Ellinger, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 2.

[2]) Starling, Journ. of Physiol., S. 17.

[3]) Barbéra, Arch. ital. di Biolog. 20, 31; Bull. de Science Med. di Bologna 1894, 1898.

[4]) Nolf und Honoré, Arch. internat. de Physiol. 2, 1905. — Nolf, Journ. de Physiol. et Pathol. génér. 1907.

[5]) Zit. nach A. Tschannen.

[6]) Pletnew, diese Zeitschr. 21.

auch noch am Tage nach der letzten Zuckerfütterung anhielt. A. Loeb[1]) fand auch bei Fütterung von Witte-Pepton, wie Asher und Barbéra[2]) bei Injektion, ein Ansteigen der Gallenproduktion, überhaupt konnte er zeigen, daß die gebildete Gallenmenge sowohl von der Menge zugeführten Eiweißes als auch von der Eiweißart abhängig ist; auch bei vollständig abgebautem Eiweiß, Erepton, fand sich eine, wenn auch wenig erhöhte Gallenbildung, wobei ein verspäteter Gallenfluß auffällig war. In neuester Zeit verglich Tschannen[3]) den Glykogengehalt der Leber nach Fütterung von verschiedenen Eiweißarten und verschiedenen Eiweißabbauprodukten; Pepton macht die Leber von Ratten geradezu glykogenfrei, während Casein die Glykogenbildung in hohem Maße hervorruft. Die Aminosäuren wirken auf die Glykogenbildung teils hemmend, teils fördernd, bei Erepton findet sich ein wohl aus solchen Einflüssen resultierender Mittelzustand. Schließlich ist zu erwähnen, daß in den histologischen Bildern der Leberzellen sowohl von Kusmine[4]) als auch von Böhm[5]) eine Differenz in Masse und Struktur vom Protoplasma und Kern nach Fütterung von Eiweiß und seinen Spaltprodukten gefunden wurde.

Aus der zitierten Literatur scheint hervorzugehen, daß die Leber auf Zufuhr von genuinem Eiweiß und Eiweißabbauprodukten, die enteral oder parenteral geschehen kann, verschieden reagiert. Es schien uns daher von Interesse, zu untersuchen, ob sich diese Differenzen im Verhalten der Leber auch auf die Eiweißspeicherung in den Leberzellen erstreckt oder mit andern Worten, ob eine Eiweißspeicherung in der Leber nach Fütterung von Eiweißspaltprodukten in gleicher Weise nachzuweisen ist wie nach Fütterung von genuinem Eiweiß.

Die Ergebnisse von Abderhalden ermutigten uns, gleich mit bis zu den Aminosäuren abgebautem Eiweiß anzufangen. Von den Höchster Farbwerken bezogen wir Erepton; dieses ist Rindfleisch, das durch Verdauung mit Pepsinsalzsäure, Trypsin und Erepsin bis auf die Aminosäuren gespalten ist, außerdem

---

[1]) A. Loeb, Zeitschr. f. Biol. 55.

[2]) l. c.

[3]) A. Tschannen, diese Zeitschr. 59.

[4]) Kusmine, Zeitschr. f. Biol. 46.

[5]) Böhm, Zeitschr. f. Biol. 51.

Salze und in geringer Menge Spaltprodukte von Kohlenhydraten und Fett enthält. Unser Präparat erwies sich als vollständig abiuret und zeigte mit Phosphorwolframsäure nur eine ganz geringe Trübung. Es war leicht bräunlich gefärbt, von pulveriger Konsistenz, wenig hyproskopisch und zeigte einen starken, aber keineswegs widerlichen Geruch, wie ihn die früheren, leicht verschmierenden Präparate offenbar aufwiesen, so daß wir von vornherein bezüglich der Nahrungsaufnahme gute Aussichten hatten. Als Versuchstiere benutzten wir sowohl Kalt- als Warmblüter; von den Kaltblütern wählten wir Salamandra maculata, die sich bei den früheren Eiweißfütterungsversuchen sehr gut bewährt hatte; die Kaltblüter halten leicht lange Hungerperioden aus, wobei die Leber leer von Reserveeiweiß wird, sie haben einen trägen Stoffwechsel, so daß man mit größerer Wahrscheinlichkeit eine bestimmte Phase abfassen kann, vor allem aber haben sie besonders große Leberzellen, was die mikroskopische Untersuchung erleichtert. Als Warmblüter wählten wir Kaninchen und konnten so die neuen Resultate mit den früheren, durch Fütterung von genuinem Eiweiß erhaltenen an ausgiebigem Material von Warm- und Kaltblütern vergleichen.

1. Versuche an Salamandern.

Zu den Fütterungsversuchen verwendeten wir nur absolute Hungertiere, nachdem wir uns durch Stichproben von Zeit zu Zeit über den Fortgang der Entleerung der Leber von Reservematerial vergewissert hatten. Die für die Ereptonversuche benutzten Tiere hatten z. B. nahezu $1^1/_2$ Jahre gehungert und dabei ungefähr die Hälfte an Körpergewicht verloren; ein anderer Teil hungerte seit einem halben Jahre, und auch bei diesem erwies sich die Leber als vollständig frei von Reserveeiweiß.

Wir fütterten zunächst ein Tier an 2 aufeinander folgenden Tagen mit je 0,05 g Erepton, das wir dem Tiere, wie gewöhnlich in unseren Versuchen, in Form einer Pille bis hinten in den Rachen schoben und es so zum Schlucken veranlaßten; den Tieren, die nicht schlucken wollten, schoben wir die Pille vorsichtig durch den Ösophagus in den Magen hinab, was bei einiger Übung ohne weiteres gelingt. Das Tier wurde 24 Stunden nach der letzten Fütterung durch Dekapitation getötet. Die

Leber war deutlich größer als bei gleichgroßen Hungertieren, die Gallenblase ganz auffallend prall gefüllt. Mikroskopisch zeigten sich nach Fixation in Formalin-Zenker oder Alkohol oder Formalin, nach Härtung in aufsteigendem Alkohol, Einbettung in Celloidin-Paraffin und Färbung mit Methylgrün-Pyronin in den Leberzellen unregelmäßig gestaltete, leuchtend rot gefärbte homogene Tropfen, die über die ganze Zelle unregelmäßig zerstreut waren. Mit Millons Reagens färbten sie sich rötlich-mahagonibraun; sie zeigten somit eine vollständige Übereinstimmung mit den Tropfen, die man durch Fütterung von genuinem Eiweiß erhält; nur waren sie kleiner und in geringerer Anzahl vorhanden. Wir schoben die Schuld daran erstens auf den extremen Hungerzustand des Tieres, bei dem eine Speicherung von Nahrungsstoffen in größerem Maßstabe schon an und für sich unwahrscheinlich erschien, und zweitens auf eine zweifellose Schädigung der Darmwand durch das Erepton. Wir hofften, beiden Übelständen abhelfen zu können, indem wir dem Erepton Kohlenhydrate beifügten, um dem Tiere mehr Nahrungsstoffe, insbesondere leicht verbrennbare Substanzen zuzuführen und die Darmschädigung herabzusetzen. Nach den früheren Untersuchungen W. Bergs[1]) stand ja fest, daß nach Fütterung von Kohlenhydraten solche für die durch Eiweißfütterung erhaltenen Bilder charakteristische Tropfen nicht auftreten und sich durch kombinierte Darreichung von Eiweiß und Kohlenhydraten an dem typischen Bilde der Eiweißspeicherung nichts ändert. Ein Tier bekam also an 2 Tagen mit 1 Tag Pause dazwischen je 0,04 g Erepton und 0,07 g Glykogen. 24 Stunden nach der letzten Fütterung wurde es getötet. Der Erfolg war ein vollkommener. Wieder war die Leber makroskopisch größer als bei Hungertieren gleicher Größe, was sich am deutlichsten an einem Querschnitt zeigt, den man an einer jedesmal durch einen bestimmten Leberlappen gut markierte Stelle legt. Mikroskopisch fanden sich die charakteristischen Eiweißtropfen gleichmäßig über die Zelle verteilt, auch öfters mit der typischen Anlehnung an den Kern (vgl. Fig. 1). Wie bei den Bildern nach Eiweißfütterung findet sich auch hier eine Verlagerung des Chromatins im Kerne an die Peripherie. Genau übereinstimmende Resultate erhielten

[1]) W. Berg, Anatom. Anzeiger 42, 1912.

wir an 6 ähnlich angestellten Kontrollversuchen; es wurden jeden Tag 0,04 g Erepton und 0,04 g Glykogen verfüttert, und zwar an 2 Tiere 2 Tage lang, an je 1 Tier 3, 4, 6, 9 Tage lang. Bei längerer Versuchsdauer bewährte es sich, nach dem 4. Tage einen Ruhetag einzuschalten. Der Zustand der Leber erwies sich jedesmal gleich, auch makroskopisch war übereinstimmend eine starke Blutfüllung der Leber zu konstatieren.

Die absolute Größe der Leberzellen ist abhängig von dem Hungerzustand, in dem sich das Tier vor der Fütterung befunden hat. Bei den mit Kohlenhydrat und Erepton gefütterten Tieren sind sie etwas größer als bei den Hungertieren, die zur Kontrolle dienten. Die beigefügte Fig. 1 stammt von einem Tiere, das fast $1^1/_2$ Jahr gehungert hatte, und zeigt die auffällige Tatsache, daß trotz dieses extremen Hungerzustandes Eiweißspeicherung durch nur zweimalige Fütterung hervorgerufen werden kann. Über die feinsten Strukturverhältnisse der Leberzellen (Mitochondrien) gibt das Bild wegen der angewendeten Technik keinen Aufschluß, doch ist die Struktur dieser Zellen in keiner Weise von der der Hungerzellen verschieden, was besondere Beachtung verdient, da gerade an solchen hungernden Leberzellen von W. Berg Sekretionsphänomene erzwungen worden sind, die sich als gänzlich different von diesen Tropfen erweisen.

Alle früheren Tierversuche mit Erepton wurden mehr oder weniger durch Reizwirkungen auf den Darm, durch Durchfall oder Erbrechen gestört. Auch bei den Salamandern trat öfters am 1. Tag eine Beschleunigung der Peristaltik auf, und das im Enddarm gewöhnlich enthaltene Gemenge von Pflanzenresten und Erde wurde entleert. Doch erholten sich die Tiere bei Beigabe von Kohlenhydraten schnell, es wurde aber sicher die Darmreizung durch die Kohlenhydrate nur vermindert und nicht aufgehoben, wie in der Literatur an einigen Stellen angegeben; denn nach 6 bis 7 Tagen begann sich die Schädigung ernstlich bemerkbar zu machen; so trat bei dem Salamander, der 9 Tage gefüttert wurde, eine starke Entzündung des Darmes auf und in der Leber waren deutlich Bakterien zu sehen, die als Pfropfe in den Capillaren saßen; trotzdem waren die Eiweißtropfen vorhanden; es liegt nahe, diese Bakterienanhäufung mit der Schädigung der Darmwand in Verbindung zu bringen.

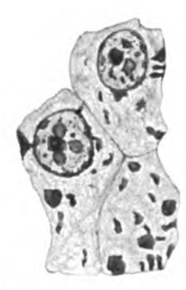



Fig. 1. Leberzellen von einem Salamander, der 17 Monate gehungert hatte und dann mit Erepton + Glykogen gefüttert wurde. 750 mal vergrößert. Fixation mit Zenker-Formol, Färbung mit Methylgrün-Pyronin. Gezeichnet mit Abbéschem Zeichenapparat auf Objekttischhöhe. Obj. 2 mm, Okular 6.



Fig. 2. Leberzellen von einem Kaninchen, das 60 Stunden gehungert hatte und mit Erepton + Kohlenhydraten gefüttert wurde. 1000 mal vergrößert.
Fixation mit Zenker-Formol, Färbung mit Methylgrün-Pyronin. Obj. 2 mm, Okular 8, sonst wie 1.

Verlag von Julius Springer in Berlin.



Es ist also damit eine Eiweißspeicherung in der Leber nach Fütterung eines Gemisches von Aminosäuren festgestellt. Die gleichen Gründe, aus denen nach Eiweißfütterung diese Tropfen als Reserveeiweiß aufzufassen sind, liegen auch hier vor: 1. Es handelte sich bei diesen Tropfen um Eiweiß, das morphologisch und chemisch vom Protoplasma der Zellen verschieden ist, also als Zelleinschlußeiweiß zu deuten sind (den näheren Nachweis siehe in der voranstehenden Arbeit), 2. verschwinden die Tropfen bei Hunger und 3. treten sie nach reichlicher Zufuhr von Erepton auf. Außer dieser Bedeutung als Reservematerial haben diese Tropfen aber noch eine andere: da sie chemisch verschieden sind sowohl vom Eiweiß im Anfangszustand der Verdauung im Darm vor der Resorption als auch vom Organeiweiß, dem Zustand am Ende der Synthese, so stellen sie eines der vielgesuchten Zwischenprodukte dar, die bei der Eiweißsynthese auftreten müssen, also auf dem Wege zwischen resorbiertem und Organeiweiß liegen.

2. Versuche an Kaninchen.

Es war von vornherein nicht zu sagen, ob es auch beim Warmblüter gelingen würde, diese Zwischenstufe zur Darstellung zu bringen und ob es auch da zur Eiweißspeicherung in der Leber kommt. Daß es so ist, haben die Versuche W. Bergs[1]) gezeigt. Ebensowenig war aber im voraus zu entscheiden, ob auch bei den Warmblütern bei ihrem von den Kaltblütern verschiedenen und besonders so viel schnelleren Stoffwechsel Eiweißspeicherung nach Ereptonfütterung nachzuweisen wäre. Als Versuchstiere verschafften wir uns einen Wurf von 8 viermonatigen Kaninchen, von durchschnittlich 1200 g Körpergewicht; wir ließen sie hungern, und da nach 60 Stunden eines der ja noch jungen Tiere einging, hielten wir für alle Tiere an einer 60stündigen Hungerperiode fest, um möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen. Ein Tier wurde getötet, und die Leber erwies sich als vollständig leer von Reserveeiweiß, makroskopisch war sie klein und sehr blutreich, was sich im mikroskopischen Präparate an einer starken Erweiterung der Capillaren wohl infolge der Verkleinerung der angrenzenden

[1]) W. Berg, l. c.

Parenchymzellen zeigte. Wir fütterten nun die eine Hälfte der Tiere mit Kohlenhydraten, die andere mit Kohlenhydraten und Erepton. Es lag uns daran, auch wenn die Versuche nicht quantitativ verwertbar waren, möglichst reine Substanzen zu verfüttern, um eventuellen Einwänden von vornherein aus dem Wege zu gehen. Wir vermieden es daher mit Brot zu füttern, sondern reichten den Tieren ein Gemisch von Mehl und Zucker; wir nahmen Rohrzucker und Mondaminmehl, weil dies praktisch frei von Eiweißstoffen ist (0,3 % Eiweißstoffe nach König[1]). Da es bei diesen Versuchen sehr darauf ankommt, daß die Tiere genügend und willig Nahrung aufnehmen, stellten wir die Versuche in 3 Serien zu je 2 Tieren an, um gemachte Erfahrungen für die folgenden Tiere verwenden zu können. Wir gaben Mehl und Zucker zuerst als Pulver gemischt und mit wenig Wasser zu einigermaßen zäher Konsistenz geknetet, jedoch zeigte sich bald, daß die Tiere eine feste Nahrung vorzogen, und so buken wir aus Mehl und Zucker Kuchen, indem wir das Mehl mit der heißen Zuckerlösung anrührten und dann ein trockenes Gebäck herstellten. Dies wurde von den Tieren gern genommen, wir gaben so viel Kohlenhydrate als die Tiere wollten, sorgten nur dafür, daß ungefähr gleichviel aufgenommen wurde, um nach Möglichkeit gleiche Bedingungen zu erhalten. Die Tiere fraßen pro Tag im Durchschnitt 50 g Kohlenhydrate, darunter 10 g Zucker. Wasser bekamen sie nach Belieben. Je 1 Tier jeder Serie bekam dazu 10 g Erepton täglich. Wir versuchten zunächst, es in die Kuchen einzubacken, die Tiere fraßen dann aber nicht so viel, daß sie 10 g pro Tag aufnahmen; so gaben wir es ihnen jeden Morgen in 25 % Lösung durch die Schlundsonde. Bei der ersten Fütterung erhielten die Tiere immer nur 5 g und erst am zweiten Tag stiegen wir auf 10 g. Um Verdauungsstörungen zu vermeiden, gaben wir zuerst 3 g Agar-Agar pro Tag oder etwas Cellulose in Form von Holzwatte zu, was wir beides in die Kuchen einbuken; es stellte sich aber als unnötig heraus, so daß wir es fortließen und somit eine eiweißfreie, praktisch sogar stickstofffreie Kost verfütterten (der Stickstoffgehalt blieb immer unter $^1/_2$ %). Wir hatten die

[1]) J. König, Chemie der menschlichen Nahrungs- und Genußmittel.

Tiere immer 8 Tage im Versuch, und jedesmal zeigte sich vom 3. bis 5. Tage ab, daß das Ereptontier deutlich lebhafter und kräftiger war, als das Kohlenhydrattier; besonders auffällig war dieses jedesmal an dem Tag, an dem wir mit der Ereptonfütterung aussetzten, die Kohlenhydrate aber weiter fütterten. Keines der Ereptontiere verlor nach dem Hunger noch an Gewicht, während das bei den Kohlenhydrattieren, wenn auch nicht in erheblichem Maße, eintrat. In einem Versuch ließen wir die Tiere beide so viel Kohlenhydrate fressen als sie wollten, und es zeigte sich, daß das Ereptontier fast das doppelte des Quantums des Kohlenhydrattiers fraß, trotzdem es doch täglich dazu noch 10 g Erepton, was dem Stickstoffgehalt nach 66 g Fleisch entspricht, zu bewältigen hatte. Nach der Tötung durch Nackenschlag zeigte schon makroskopisch die Leber bei den verschieden ernährten Tieren ein verschiedenes Aussehen. Bei den Ereptontieren war sie durchweg dunkler und blutreicher; außerdem war die Läppchenzeichnung auffällig ausgeprägt, während man sie bei den Kohlenhydrattieren kaum erkennen konnte; es rührt dies wohl von der erhöhten Blutzufuhr zur Leber her. Die mikroskopische Untersuchung der Leber ergab bei allen Ereptontieren ein übereinstimmendes positives Resultat ohne einen einzigen Ausfall. Die Präparate wurden auf die gleiche Weise wie bei den Salamanderlebern hergestellt. Alle Zellen waren ziemlich gleichmäßig erfüllt mit roten homogenen Tropfen unregelmäßiger Gestalt, die sich in gleicher Weise wie die Tropfen nach Eiweißfütterung fixierten und färbten. Die beigefügte Fig. 2 bringt solche Zellen bei 1000facher Vergrößerung zur Anschauung. Auch hier ist ein Anliegen der Tropfen an den Kern in vielen Fällen zu finden. In den Leberzellen der Kohlenhydrattiere fanden sich keine roten homogenen Tropfen, sondern höchstens kleine, vakuolisierte Gebilde anderer Färbbarkeit. Von diesen zeigte W. Berg[1]) früher schon, daß sie beim Verbrauch aus den homogenen Tropfen entstehen, wobei zu bemerken ist, daß die homogenen Tropfen relativ schnell in die vakuolisierten Gebilde übergehen, während diese dann langsamer resorbiert werden, daß aber niemals bei erneuter Fütterung

---

[1]) l. c.

diese vakuolisierten Tropfen wieder zu homogenen werden, sondern dann neue homogene neben dem vakuolisierten auftreten.

Wir dürfen also diesen Untersuchungen entnehmen, daß nach Fütterung von Aminosäuren Eiweiß in der Leber gespeichert werden kann, daß das im Organismus synthetisierte Eiweiß als Zelleinschlußeiweiß in der Leber auftritt. Daß dieser Zustand recht schnell eintritt, dann aber stationär bleibt, zeigt sich aus übereinstimmenden Bildern bei Tieren, die 8, 24 und über 30 Stunden nach der letzten Ereptonfütterung getötet wurden.

Was die Schädigung der Darmwand anbetrifft, so wurde sie auch hier durch die reichliche Beigabe von Kohlenhydraten stark herabgesetzt, Durchfall bekam kein einziges Tier; trotzdem traten nach einiger Zeit sicher erhebliche Störungen ein; vom 6. bis 7. Tage an wurden die Ereptontiere weniger lebhaft und schwächer, doch waren sie auch dann noch kräftiger als die Kohlenhydrattiere. Nach der Tötung war makroskopisch eine starke Füllung der Darmblutgefäße zu sehen, mikroskopisch zeigte sich eine äußerst starke Leukocytose, die eine Verdauungsleukocytose weit übertraf.

Da wir die Kaninchen nur 60 Stunden hungern ließen, fanden wir, wie zu erwarten (vgl. die Arbeiten von Swirski[1]), noch reichlichen Mageninhalt, der unsere Versuche nicht störte, da sich die Leber nach dem Hungern als frei von Reserveeiweiß erwiesen hatte. Die Tiere scheinen diesen Mageninhalt nach Möglichkeit festzuhalten, wir fanden ihn am Ende des Versuches wenig vermindert, 8 Stunden nach Einfüllung des Ereptons stark verdünnt und dünnbreiig, 30 Stunden nachher wieder fest. Es ist möglich, daß deshalb die Tiere das Erepton relativ gut vertrugen, da es vielleicht langsamer in den Darm abgegeben wird als bei übermäßig ausgehungerten Tieren. Um uns zu vergewissern, daß dieser Mageninhalt keine Fehlerquelle darstelle, untersuchten wir ihn auf seinen Stickstoffgehalt nach Kjeldahl; er enthielt im Durchschnitt 0,4% Stickstoff (der Gehalt war auffällig konstant), also keine Eiweißmenge, die die Größenordnung im Mehl überschreitet. Interessant war,

[1]) Swirski, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 41 u. 48.

daß schon 24 Stunden, nachdem wir 10 g Erepton eingegossen hatten, dieser Mageninhalt wohl dünnflüssiger war als bei den Kohlenhydrattieren, aber den gleichen, in einem Falle sogar geringeren prozentualen Stickstoffgehalt hatte als bei den stickstofffrei ernährten Tieren.

Zusammenfassung.

1. Nach Fütterung eines Gemisches von Aminosäuren, das durch vollständigen Abbau des Eiweißes erhalten wird (Erepton), konnten wir morphologisch Eiweißspeicherung in der Leber nachweisen.

2. Die so gewonnenen Bilder der Leberzellen unterscheiden sich prinzipiell in keiner Weise von denen, die man nach Fütterung von genuinem Eiweiß erhält.

Es bedeutet diese Eiweißspeicherung nach Ereptonfütterung eine auf gänzlich anderem Wege gewonnene Bestätigung der mit analytisch-chemischen Methoden gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Eiweißsynthese im tierischen Organismus.

Verschiedenheiten der Leberfunktionen nach Fütterung von genuinem Eiweiß und Eiweißabbauprodukten, wie sie aus der angegebenen Literatur hervorzugehen scheinen, sind bezüglich der Eiweißspeicherung nach Eiweiß- und Ereptonfütterung nicht vorhanden, doch halten wir es nach im Gange befindlichen Versuchen für möglich, daß zwischen dem genuinen und dem gänzlich abgebauten Eiweiß solche Zwischenstufen existieren können, die nach Einverleibung durch sekundäre Beeinflussung Verschiedenheiten im Bilde der Leberzellen hervorrufen können.

Zur Frage nach der Reversibilität der Invertasewirkung.

Von

A. Blagowestschenski.

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Moskau.)

(Eingegangen am 3. März 1914.)

Seit dem Erscheinen der Arbeit von L. Wilhelmy[1]) über die Rohrzuckerhydrolyse hat man diese Reaktion für ein klassisches Beispiel eines irreversiblen chemischen Prozesses gehalten. Durch Osakas[2]) Untersuchungen, die 1908 ausgeführt wurden, ist diese Anschauung nur in gewissem Grade modifiziert worden.

Für Konzentrationen über 50 % hat man eine Reaktionsgrenze gefunden, die übrigens der vollständigen Hydrolyse sehr nahe kommt: 99,8 % für 50 %ige und 98,9 % für 80 %ige Lösungen. Wie man hieraus sieht, vollzieht sich die Hydrolyse, sogar bei sehr hohen Konzentrationen, fast bis zum Ende. Bei mittleren und niedrigen Konzentrationen ist von einer praktisch bemerkbaren synthetischen Reaktion keine Rede. Diese Vollständigkeit der Hydrolyse bewog A. C. Hill[3]), als Objekt seiner Untersuchung über die Reversibilität der Enzymwirkungen die Maltose anstatt der Saccharose zu wählen.

Auffallenderweise gilt nach den neuesten Ansichten diese Frage als in positivem Sinne entschieden. So schreibt H. Euler in seiner „Allgemeinen Chemie der Enzyme" (S. 189): „Bemerkenswert ist, daß Rohrzucker aus Glucose und Fructose durch gewisse Invertasen entstehen soll". Weniger kategorisch äußert sich Czapek in der letzten Auflage seiner „Biochemie der Pflanzen" (S. 123), aber auch für ihn besteht der Zweifel

---

[1]) L. Wilhelmy, Pogg. Ann. Chem. 81, 413, 499, 1850.
[2]) Y. Osaka, Journ. Coll. of Sc. 25, Art. I, S. 1 bis 8. Tokio 1908.
[3]) A. C. Hill, Journ. Chem. Soc. Transact. 73, 634 bis 658, 1898.

nur darin, welches Enzym an der Synthese der Saccharose teilnimmt.

Wie bekannt, ist eins der Kennzeichen eines umkehrbaren Prozesses in dem Reaktionsgemisch eine Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten, die in der Voraussetzung, daß die Reaktion nicht reversibel sei, berechnet wurden. Die Geschwindigkeit der Saccharosehydrolyse in jedem gegebenen Moment wird durch folgende Gleichung bestimmt[1]):

$$\frac{dx}{dt} = k(a - x) \quad \ldots \ldots \ldots \quad (1)$$

Geht die Reaktion in eine umkehrbare über, so nimmt die Geschwindigkeitsgleichung folgende Form an:

$$\frac{dx}{dt} = k(a - x) - k_1 x \quad \ldots \ldots \ldots \quad (2)$$

Es leuchtet ein, daß, wenn man die Möglichkeit des umgekehrten Prozesses nicht in Betracht zieht, die k-Größe in der Gleichung 1 nicht unveränderlich bleibt, sondern ständig fallen wird.

O'Sullivans und Tompsons[2]) Untersuchungen zeigten noch 1890, daß k während der ganzen Reaktionszeit konstant bleibt. Andere Forscher [V. Henri[3]), A. Brown[4])] fanden sogar eine Geschwindigkeitszunahme gegen Ende der Reaktion, aber Hudson[5]) erklärte diese Abweichung von dem normalen Gange durch die Anwesenheit der Mutarotationserscheinungen, die bei der Zugabe von etwas Lauge zur Lösung, die man im Polarimeter untersucht, verschwinden. Mithin gab es keine Angaben über die Reversibilität vom Standpunkte der Reaktionskinetik.

V. Henri bemerkte (1901), daß bei Zugabe verschiedener Mengen Invertzucker zu dem reagierenden Gemisch, 0,5 N-

---

[1]) Hierzu bedeuten: a anfängliche Menge der Saccharose, x der zur Zeit t invertierte Teil der Saccharose und k die Konstante.

[2]) O'Sullivan und Tompson, Journ. Chem. Soc. 57, 834, 1890.

[3]) V. Henri, Lois générales de l'action des diastases. Thése. Paris 1902; Zeitschr. f. physikal. Chem. 39, 194 bis 216; Compt. rend. Soc. Biol. 53, 288, 1901; 58, 610 bis 613, 1905; Arch. di fisiologia 1904, I, 299 bis 324.

[4]) A. Brown, Journ. Chem. Soc. Transact. 81, 373 bis 388, 1902.

[5]) C. S. Hudson, Journ. Amer. Chem. Soc. 30, 1160 bis 1166, 1564 bis 1583, 1908.

Saccharoselösung und Invertase, der hydrolysierte Rohrzucker im Verhältnis zur hinzugefügten Menge Inversionsprodukte prozentualiter abnimmt. Dieselbe Erscheinung beobachtete auch A. Brown, der die Vermutung aussprach, daß die wahrscheinliche Ursache dieser Verzögerung der Reaktion in der Bindung der Enzyme sowohl durch Rohrzucker als auch durch seine Komponenten liege. Somit vermindert sich mit wachsender Menge der Enzym-Invertzuckerverbindungen diejenige der aktiven Invertase, so daß folglich die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt.

Wir gehen nun zu den Arbeiten über, in denen die angeblich stattgefundene Rohrzuckersynthese beschrieben wird. Die ersten Versuche in dieser Richtung unternahm Wroblewski[1]), der zum Nachweis der Reversibilität den Rohrzucker mit 0,028 %iger HCl invertierte, neutralisierte, mit Wasser verdünnte und mit käuflichem Invertasepräparat versetzte.

Die Rotationsbeobachtung gab folgende Resultate:

	Versuch 1.		Versuch 2.			Versuch 3.			
Zeit (in Stunden)	0	1,33	0	1	12	0	1	2	12
α_0 (mit Invertase) .	− 14,0°	− 12,6°	− 20,0°	− 18,1°	− 19,9°	− 20,1°	− 16,9°	− 12,9°	− 13,4
α_0 (ohne Invertase) .	− 14,0°	− 14,0°	—	—	—	—	—	—	—

Man sieht aus dieser Tabelle, daß keine Kongruenz in den Endresultaten des 2. und 3. Versuchs vorliegt, die, wie es scheint, aus den gleichen anfänglichen Rotationen in den Lösungen derselben Konzentration vor sich gingen: Nach 12 Stunden änderte sich die Rotation der einen Lösung um 0,1° und der anderen um 6,7°. Wodurch diese Verschiedenheit verursacht wird, ist aus der Arbeit Wroblewskis nicht zu ersehen. Die zweite Eigentümlichkeit dieser Versuche ist ihre sehr kurze Dauer, während Hill, Emmerling[2]), Armstrong[3]) und andere festgestellt haben, daß die synthetischen Enzymreaktionen in den wässerigen Lösungen sehr langsam verlaufen und erst nach einigen Monaten das Gleichgewicht erreichen.

[1]) Journ. f. prakt. Chem., neue Folge, 64, 1 bis 70, 1901.

[2]) Emmerling, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 34, 601 bis 605, 2206 und 2207.

[3]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 76, 592 bis 599, 1905.

Visser[1]) behandelt in seinen Untersuchungen über die Reaktionsgeschwindigkeit in den homogenen Systemen im Jahre 1905 auch die Saccharoseinversion. Er benutzte ein Invertasepräparat von Merck, bereitete eine $^n/_4$-Saccharoselösung (8,55 $^0/_0$ ig) und ermittelte die Veränderlichkeit der Rotationsfähigkeit. Die Rotation am Schluß betrug bei der Hydrolyse — 3,26°. Als er die Invertase durch HCl ersetzte, erhielt Visser — 3,42° und zog daraus den Schluß, daß die Reaktion nicht zu Ende gehe und bei 98,94 $^0/_0$ stehen bleibe. Wie weit eine solche „Kontrollierung" eines Katalysators durch einen anderen in Übereinstimmung mit dem zweiten Gesetz der Thermodynamik steht, braucht nicht gesagt zu werden. Ein anderer Versuch wurde mit einem künstlichen Gemisch von Glucose und Fructose ausgeführt. Die anfängliche Rotation war in diesem Falle — 12,46°, am Ende — 12,29°, d. h. es wurde eine Veränderung um 0,4 $^0/_0$ beobachtet. Berechnen wir aus der Rotationsgröße die Konzentration der Zuckerlösung, so finden wir sie bei annähernd 30 $^0/_0$ liegend. Folglich stehen diese Angaben Vissers in Widerspruch zu den Versuchen Osakas, der bei solcher Konzentration keine Synthese beobachtet hatte. Und Visser selbst wagte es nicht zu behaupten, daß die Reversibilität der Invertasewirkung in seinen Versuchen bewiesen sei und vermutete nur die Möglichkeit eines synthetischen Prozesses.

Pantanelli[2]) fand (1906), daß die Nährflüssigkeit, auf der Mucor gewachsen war, in ihrer Einwirkung auf den Invertzucker eine Synthese in höherem Grade als in Vissers Versuchen erzeugte, und zwar in basischem Milieu energischer als in saurem. In seinen folgenden Arbeiten äußerte sich Pantanelli in dem Sinne, daß man in seinen Versuchen von keiner Saccharosebildung sprechen könne, wohl aber von Hexosenpolymerisation. Er wies die Verschiedenheit der invertierenden und Polymerisation erzeugenden Faktoren nach.

Kohl[3]) arbeitete bei seinen Untersuchungen in streng neutralem Medium und gebrauchte als Enzympräparate Glycerin-

[1]) Visser, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 257 bis 309, 1905.

[2]) Pantanelli, Atti della Reale Academia dei Lincei 15, 587 bis 594, 1906; 16, Sem. 2, 419 bis 428, 1907; [5], 19, I, 389 bis 394, 1910. — Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 1908, 494 bis 504.

[3]) Kohl, Beihefte z. Botan. Centralbl. 23, I, 64a—o, 1908.

extrakt von untergäriger Bierhefe. Das Reduktionsvermögen bestimmte er nach Bertrand. Zur Versuchsausführung benutzte er eine Serie von Probezylindern und führte in jeden von diesen 5 ccm 10%ige Saccharoselösung, 1 ccm Glycerinextrakt und etwas Thymol ein. Für die einzelnen Bestimmungen wurde der ganze Inhalt eines Probezylinders genommen und je nach Bedarf verdünnt. Er fand, daß, solange die Hälfte der vorhandenen Saccharose nicht zerlegt wird, die Hydrolyse annähernd dem Massenwirkungsgesetze folgt, worauf eine „Reversion“ eintritt. Diese letzte erreichte eine bedeutende Größe: der ganze Invertzucker revertierte sich zwischen der 23. und 24. Stunde nach Beginn des Versuchs, und die Lösung hatte keine reduzierende Wirkung. Später setzte Inversion von neuem ein, dann wieder Reversion usw. In dem folgenden Versuche (mit Synthese) nahm Kohl 60 ccm Invertzucker, wovon jedes Kubikzentimeter dieser Lösung 70,6 mg reduzierenden Zuckers enthielt. Zu dieser Lösung fügte man 40 ccm Glycerinextrakt und etwas Chloroform hinzu. Es ergaben sich folgende Resultate: Das reduzierende Vermögen schwankte während der ganzen Zeit des Versuchs um 70,6 mg herum, von diesem Werte zur größeren Hydrolyse um 2,2 mg abweichend. Diese Differenz wird wohl vermutlich durch unvollständige Chloroformentfernung verursacht. In den anderen Stadien der Reaktion vermindert sich die reduzierende Wirkung bis auf 67,3 mg in einem Kubikzentimeter. Diese Erscheinung sieht Kohl als Reversion an. In den folgenden Bestimmungen jedoch stieg die Reduktionskraft von neuem bis auf 71,8 mg. Wie man unter diesen Umständen von einer Saccharosesynthese sprechen kann, ist für mich unklar.

Abgesehen davon, daß die zitierten Arbeiten sehr wenig Klarheit und Überzeugungskraft aufweisen, wurde die Frage über die Reversibilität der Invertasewirkung nicht mehr aufgeworfen. Vorliegende Arbeit ist zur Nachprüfung der Angaben Kohls und Vissers ausgeführt worden.

Das Invertasepräparat wurde in den ersten Versuchen gemäß den Angaben von Kohl hergestellt. Die untergärige Bierhefe wurde dreimal mit Wasser ausgewaschen, ausgepreßt, auf Filterpapier getrocknet, mit dreifacher Menge Glycerin gemischt und drei Tage bei häufigem Umrühren digeriert. Der Auszug,

der eine dicke tiefbraune Flüssigkeit darstellte, wurde durch Papier und eine Chamberlandkerze filtriert. Das so erhaltene Enzympräparat hatte eine im Vergleich zu den von O'Sullivans und Tompsons, Hudsons und anderen erhaltenen Präparaten sehr schwache Aktivität: 50 ccm des Auszugs hydrolysierten die Hälfte der Saccharose in 200 ccm 10%iger Saccharoselösung erst nach 24 Stunden. Dieser Hefenglycerinextrakt enthielt außer der Invertase noch Amygdalase, keine Maltase. Die Bestimmungen wurden folgenderweise ausgeführt. 10 oder 5 ccm einer Versuchslösung wurden mit einer Pipette entnommen und in ein Meßkölbchen, welches 5 ccm 2%iger Sodalösung enthielt, eingefüllt. Dann wurde Sodalösung nach Hudson zur gleichzeitigen Unterbrechung der Enzymtätigkeit und Mutarotationseinwirkung hinzugefügt. Auffüllung des Kölbchens mit Wasser auf 50 ccm, Entnahme aus dieser Lösung einer nötigen Menge für die Rotationsbestimmung und von 10 ccm für die Bestimmung des Reduktionsvermögens. Diese 10 ccm verdünnte man, wie es für die Bestimmung nach Bertrand nötig ist. Die polarimetrischen Beobachtungen wurden mit dem Lippich-Landoltschen Apparate ausgeführt, nicht eher als nach 7 Minuten und nicht später als nach 2 Stunden, wie dies Hudson vorschreibt. Als Antisepticum wurde Toluol benutzt. Die Reaktion war in allen Versuchen neutral (mit Lackmus). In den ersten Versuchen (1 bis 3) wurde die Saccharose-Hydrolyse studiert.

Versuch 1.

Saccharose 20 g. Hefe-Glycerinauszug 50 ccm. Wasser q. s. für 200 ccm Toluol. Temperatur ca. 18°.

Zeit		Reduzierender Zucker		$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
Stunde	Minute	mg	%	
0	—	—	—	—
1	—	3,5	6,6	0,05458
3	—	8,0	15,3	0,05488
5	10	9,3	17,8	0,03758
7	—	12,4	23,6	0,03832
24	10	25,4	48,4	0,02722
30	45	34,2	65,1	0,03424
48	15	35,2	67,0	0,02384
54	25	35,8	68,2	0,02090
56	45	37,6	71,6	0,02202
∞	—	52,7	100,0	—

Wie man sieht, haben wir keine den von Kohl beobachteten ähnliche Erscheinungen erhalten. Die Schwankungen der k-Größe sind völlig durch Versuchsfehler zu erklären, da der Unterschied um 1 mg des reduzierenden Zuckers zwischen den wirklichen und den gefundenen Werten, der bei der Bestimmung nach Bertrand sehr leicht möglich ist, einen bedeutenden Prozentfehler, besonders bei kleinen Zuckermengen, ergibt.

Versuch 2 zeigt, daß diese Schwankungen, bei gleichzeitiger Verminderung sowohl der Enzymquantität als auch der Zeitintervalle zwischen den einzelnen aufeinanderfolgenden Bestimmungen, zunehmen.

Versuch 2.

Saccharose 20,167 g. Hefe-Glycerinauszug 33,0 ccm. Wasser q. s. für 200 ccm Toluol. Temperatur ca. 16°.

Zeit		Reduzierender Zucker		$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
Stunde	Minute	mg	%	
0	—	—	—	—
—	15	1,1	2,1	0,0840
—	30	1,7	3,2	0,0654
1	—	2,7	5,1	0,0516
1	15	3,3	6,1	0,0510
1	30	4,8	9,1	0,0636
2	—	5,9	10,6	0,0558
2	30	6,2	11,8	0.0498
3	30	8,8	16,7	0,0522
4	30	9,4	17,7	0,0432
20	50	20,7	39,1	0,0234
21	50	22,5	42,5	0,0246
22	50	23,1	43,7	0,0246
23	50	24,7	46,7	0,0258
24	50	23,6	44,6	0,0234
25	50	23,9	45,2	0,0228
27	50	24,2	45,7	0,0216
44	50	31,3	59,2	0,0198
45	50	32,4	61,3	0,0216
47	50	31,3	59,2	0,0186
48	50	33,6	63,5	0,0204
54	50	34,2	64,7	0,0198
69	50	37,8	71,5	0,0180
72	50	38,7	73,2	0,0180
74	50	37,8	71,5	0,0168
86	50	39,9	75,4	0,0144
129	50	45,2	85,4	0,0138
131	50	48,0	90,7	0,0162
152	50	51,5	97,4	0,0216
157	20	49,6	93,8	0,0162
177	50	50,8	96,0	0,0168
201	20	49,6	93,8	0,0216
∞	—	52,9	100,0	—

Dieser Versuch weist in fünf Fällen eine Abweichung vom normalen Reaktionsgang auf, und nur in dem einen beträgt die Differenz in der Milligrammzahl des reduzierenden Zuckers bei zwei aufeinander folgenden Bestimmungen 1,9 mg, in anderen sind diese Unterschiede noch geringer. Die Geschwindigkeitskonstanten stimmen, wenn man von ihrer Größe in den ersten $4^1/_2$ Stunden absieht, da hier Versuchsfehler sehr stark hervortreten, gut überein.

Aus Versuch 3 geht hervor, daß sogar solche kleinen Schwankungen nicht beobachtet werden, wenn man die Rotationsveränderung mißt.

Versuch 3.

Saccharose 109 g. Hefe-Glycerinauszug 40 ccm. Wasser q. s. für 500 ccm Toluol. Temperatur ca. 18°.

Zeit (Stunden)	α_D	Reduz. Zucker mg	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ (für α)	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$ (f. reduz. Zucker)
0	+ 5,84°	0	—	—
1	+ 5,62°	2,3	0,02974	0,02657
3	5,45°	4,4	0,01859	0,01642
5	5,45°	6,6	0,01123	0,01435
7	5,21°	7,4	0,01252	0,01136
24	4,16°	17,8	0,01055	0,00902
26	4,09°	18,3	0,01020	0,00857
28	4,05°	23,7	0,00972	0,01069
48	3,34°	28,5	0,01032	0,00777
50	3,25°	28,8	0,00862	0,00755
52	3,21°	29,3	0,00845	0,00741
54	3,16°	29,8	0,00832	0,00729
120	1,61°	47,2	0,00690	0,00604
122	1,60°	49,8	0,00682	0,00643
124	1,57°	47,2	0,00678	0,00584
126	1,54°	49,8	0,00674	0,00622
144	1,23°	52,7	0,00661	0,00595
145	1,20°	53,9	0,00663	0,00612
146	1,16°	52,1	0,00668	0,00576
148	1,16°	53,5	0,00659	0,00593
150	1,16°	55,6	0,00651	0,00987
154	1,13°	53,5	0,00655	0,00581
168	0,90°	56,0	0,00638	0,00546
169	0,87°	57,0	0,00642	0,00576
170	0,89°	56,2	0,00633	0,00559
171	0,86°	55,7	0,00636	0,00557
172	0,82°	62,0	0,00642	0,00657
312	— 0,49°	72,7	0,00593	0,00506
432	— 0,93°	77,3	0,00557	0,00430
528	— 1,06°	88,4	0,00475	0,00635
596	— 1,31°	86,4	0,00436	0,00412
∞	— 1,67°	91,6	—	—

Hier gibt α_D nur in einem Falle statt einer Verminderung eine Zunahme um 0,02°. Die Veränderung des Reduktionsvermögens, wie solche für α, überschreiten nicht die Grenzen des möglichen Fehlers. Alle diese Tatsachen zwingen uns zu der Behauptung, daß sogar bei genauem Befolgen der Vorschriften Kohls die Reaktion nicht so sprunghaft verläuft, wie es bei seinen Versuchen der Fall ist.

Die Versuche 4 bis 7 wurden mit Glycerinextrakt ausgeführt und hatten den Zweck, den Rohrzucker aus seinem Spaltungsprodukte zu synthetisieren. Der Invertzucker wurde nach Kohl durch Saccharosehydrolyse mit HCl bereitet und mit NaOH neutralisiert. Diese Lösungen nahmen bei langem Stehen mit Glycerinextrakt eine braune Färbung an, und die Polarisationsmessungen ergaben, sogar nach dem Verdünnen, nur sehr schwankende Resultate. Immerhin konnte man sagen, daß wir keine synthetische Reaktion für 20- und 30%ige Lösungen unter diesen Umständen hatten. Und die Reduktionsfähigkeit ergab eine so kleine Änderung, daß ich kein Recht habe, sie als Reversibilität der Invertasewirkung hinzustellen. Diese Resultate konnte man übrigens auf Grund der Methode der Invertzuckerbereitung voraussagen.

Versuch 4 bis 7.

Nr.	t °C	Konzentration %	α_D		Reduzierender Zucker	
			Anfang	Ende	Anfang	Ende
4	ca. 20	ca. 20	— 1,44°	— 1,51°	82,3	81,7
5	„ 20	„ 20	— 1,51°	— 1,49°	81,0	80,1
6	„ 20	„ 30	— 2,16°	— 2,21°	61,7	61,4
7	„ 35	„ 20	— 1,44°	— 1,51°	82,3	82,0

Infolge einer ganzen Reihe von Schwierigkeiten, die mit dem Gebrauch des Glycerinextrakts verbunden waren (schlechtes Ausfließen aus den Pipetten, dunkle Färbung), wurde folgende Versuchsreihe mit der Invertase (nach L. Michaelis[1]) dargestellt, nur ersetzte ich das Chloroform durch Toluol) ausgeführt. Dieses Enzympräparat war stärker als Glycerinextrakt, hatte eine schwach-gelbe Färbung und enthielt außer

[1]) Siehe Abderhaldens „Biochemische Arbeitsmethoden" 3, 16.

der Invertase und Amygdalase noch Maltase. Für die Versuche 8 bis 17 wurden Urlösungen (10 bis 20 %) der Glucose (Merck) und Lävulose (Kahlbaum) mit einiger Fermentmenge bereitet. Für das Studium der hohen Konzentrationen pipettierte ich 10 ccm der reagierenden Lösung ab, goß sie in ein genau gewogenes Gläschen mit einem Glasstöpsel ein, wog von neuem und kondensierte vorsichtig in vacuo über H_2SO_4. Nach wiederholter Wägung fügte ich etwas Toluol hinzu, und das Gläschen blieb 1 Monat lang stehen. Die Grundlösung wurde sowohl am Anfang als auch am Ende des Versuchs analysiert. Man kann die Resultate dieser Analysen aus der folgenden Tabelle ersehen.

Versuch 8.

Glucose 16,841 g, Lävulose 16,797 g, Invertase 20 ccm. Wasser q. s. für 200 ccm Toluol. Temperatur ca. 18°.

Datum	Gewicht der 10 ccm der Lösung g	α_D	Reduzierender Zucker mg
12. XI.	10,6757	— 2,04°	66,1
12. XII.	10,6739	— 2,04°	65,0

Nach Verlauf eines Monats beobachtete man denn auch eine gewisse Veränderung der Reduktionsfähigkeit. Wenn diese Verminderung durch Erreichung des Reaktionsgleichgewichts verursacht worden wäre, so könnte man durch Einengung der Lösung dieses Gleichgewicht zur Seite der Synthese hin verschieben. Aber solche Konzentrierung hatte keinen Einfluß.

Versuche 9 bis 14.

Nr.	Gewicht der 10 ccm der Lösung		Konzentration		α_D		Reduzierender Zucker	
	Anfang	Ende	Anfang %	Ende %	Anfang	Ende	Anfang mg	Ende mg
9	10,6656	4,6292	17	37	— 2,03°	— 1,97°	65,0	65,2
10	10,6327	3,5880	17	50	— 2,03°	— 1,99°	65,0	64,2
11	10,6402	3,4152	17	52	— 2,03°	— 2,00°	65,0	64,3
12	10,6788	3,2724	17	55	— 2,03°	— 2,00°	65,0	64,3
13	10,8368	4,8334	21	49	— 2,86°	— 2,91°	82,0	79,4
14	10,4393	2,0962	11	49	— 1,71°	— 1,73°	84,0	81,7

Man sieht z. B. aus vorstehender Tabelle, daß dort, wo die Rotation sich am meisten (auf 0,06°!) geändert hatte, die Reduktionsfähigkeit dieselbe blieb. Die Abweichungen von der vollständigen Hydrolyse in diesen Versuchen sind gering und bewegen sich innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler.

Endlich bei noch größeren Konzentrationen haben wir folgende Ergebnisse erhalten:

Versuche 15 bis 17.

Nr.	Gewicht der 10 ccm		Konzentration		α_D		Reduzierender Zucker	
	Anfang	Ende	Anfang %	Ende %	Anfang	Ende	Anfang mg	Ende mg
15	10,4505	1,4443	10,7	75	— 1,71°	— 1,67°	84,0	83,3
16	10,4240	1,3511	10,7	79	— 1,71°	— 1,67°	84,0	82,6
17	10,4000	1,3310	10,7	80	— 1,71°	— 1,65°	84,0	83,3

Bei den letzten Konzentrationen könnte man schon, nach Osaka, eine Saccharosesynthese erwarten, aber ich kann nicht behaupten, daß meine Zahlen auf eine solche hinweisen. Da aber einige von meinen Lösungen eine wenn auch nur sehr geringe Neigung, die Rotation und Reduktion zu verändern, zeigten, versuchte ich, eine Zusammensetzung der Kohlenhydratgemische am Versuchsende zu bestimmen. Zu diesem Zwecke nahm ich 104 g einer Invertzuckerlösung, die 16,841 g Glucose, 16,797 g Lävulose und 20 ccm Invertase in 200 ccm Gesamtvolumen enthielt, kondensierte sie bis auf 42,31 g und ließ sie 2 Monate bei Toluolzusatz stehen. Die Saccharosebestimmungen, die in dieser Lösung nach Schulze, Lemeland[1]) und Hirschberg[2]) ausgeführt wurden, gaben negative Resultate. Die Osazonuntersuchung zeigte außer der Anwesenheit von Glucosazon noch die eines anderen Osazons an. Letzteres war in kaltem Wasser unlöslich, in heißem Wasser, in Methylalkohol und in einem Gemisch gleicher Volumina Aceton und Wasser leicht löslich. Die mikroskopische Untersuchung ergab Krystallisation in kleinen Nädelchen, die stets kugelförmig zusammengeballt waren. Das frisch bereitete Osazon hatte eine orangegelbe Färbung, die beim Trocknen ins Braune überging.

[1]) Journ. de Pharmac. et de Chem. **1910**, 298.

[2]) Berl. klin. Wochenschr. **49**, 409, 1912.

Die Ausbeute dieses Osazons war so gering, daß es unmöglich war, seinen Schmelzpunkt mit Sicherheit zu bestimmen. Das unreine Osazon (aus der ersten Krystallisation) schmolz bei 187 bis 190°. Diese Eigenschaften sind denen des Osazons, das A. C. Hill bei der Maltosesynthese erhalten hatte, ähnlich. Da im Invertasepräparat, das nach der Methode von L. Michaelis hergestellt wurde, Maltase und Amygdalase anwesend sind, so ist die Möglichkeit vorhanden, daß die Maltose- oder die Isomaltosesynthese aus der Glucose entstehen. Die größere Veränderung der Rotationsfähigkeit im Vergleich zu der Reduktionsfähigkeit kann seine Erklärung in dieser Synthese finden.

Alle diese Tatsachen führten mich zu folgenden Schlüssen:

1. Es sind gar keine Anzeichen vorhanden, auf Grund deren die Frage der enzymatischen Synthese des Rohrzuckers im positiven Sinne gelöst ist.

2. In Anbetracht der Untersuchungen Osakas hat es keinen Sinn, die Saccharosesynthese in Lösungen, die schwächer als 50 bis 60% sind, zu suchen, ohne von vornherein in Widerspruch mit dem zweiten Satz der Thermodynamik zu treten.

3. Es sind keine „Reversionen“ (in Kohls Sinne) bei der Invertasewirkung auf die Saccharose zu verzeichnen.

4. Die Geschwindigkeitsänderung bei der Hydrolyse äußert sich durch die gewöhnliche Gleichung der monomolekularen Reaktionen. Die Schwankungen der konstanten Größe lassen sich leicht durch Versuchsfehler erklären. Eine Abnahme der konstanten Größe beim Reaktionsende wird wahrscheinlich durch Bindung der Invertase mit Hydrolysenprodukten verursacht.

5. Es ergibt sich die Möglichkeit der Maltose- (resp. Isomaltose-) Synthese bei der Einwirkung der Invertasepräparate auf die Invertzuckerlösungen.

Über die Methylierung von Eiweißstoffen.

Von

J. Herzig und K. Landsteiner.

(Eingegangen am 10. März 1914.)

Durch serologische Versuche und andere qualitative Reaktionen konnte[1]) eine Veränderung von Serumeiweiß durch Behandlung mit alkoholischen Säuren[2]), mit Essigsäureanhydrid und mit Diazomethan nachgewiesen werden. Durch dieses Resultat wurden wir veranlaßt, die Reaktionen quantitativ weiter zu verfolgen und haben vorerst das mit Diazomethan hergestellte Präparat untersucht. Die Vorteile, die dieses Methylierungsverfahren bietet, sind klar ersichtlich. Von der Methylierung abgesehen, kann Diazomethan kaum verändernd einwirken, und außerdem sind die Ausbeuten nahezu quantitativ. Wir haben auch andere Eiweißstoffe der Reaktion unterworfen, und die erzielten Resultate sollen nun vorläufig mitgeteilt werden.

Die Angaben in der bereits erwähnten Publikation ergänzend, sei hier hervorgehoben, daß beim Casein und der Gelatine von Skraup bereits Beobachtungen über die Methylierung vorliegen. Skraup und Krause[3]) bzw. Böttcher[4]) haben mit Kali und Jodmethyl in der Wärme gearbeitet; sie erhielten im Maximum eine Ausbeute von nur 40% des Ausgangsmaterials. Das analysierte Reaktionsprodukt war beim Casein jodhaltig (5,18 bis 5,51% J). Es ist außerdem noch eine Untersuchung von Rogoziński[5]) über die Methylierung

[1]) Landsteiner, diese Zeitschr. **58**, 362, 1913.

[2]) Siehe auch Suida, Monatsh. f. Chem. **25**, 1107, 1904; **26**, 413 u. 855, 1905; **27**, 225 u. 1193, 1906.

[3]) Monatsh. f. Chem. **30**, 447, 1909.

[4]) Monatsh. f. Chem. **31**, 1035, 1910.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, 371, 1912.

von Clupein anzuführen. Der Autor benützte Dimethylsulfat und Alkali, und zwar abweichend vom Vorgange Skraups, um Zersetzungen möglichst zu vermeiden, bei gewöhnlicher Temperatur.

Wir haben, wie schon gesagt, zunächst nur mit Diazomethan methyliert. Die Stoffe sind in möglichst feiner Verteilung (ohne vorhergehendes Trocknen, s. l. c.) mit einer überschüssigen Menge von ätherischer Diazomethanlösung durch längere Zeit (ca. 10 Tage) stehen gelassen worden. Das überschüssige Diazomethan wurde abdestilliert oder abfiltriert und die Substanz dann auf dem Filter mit Alkohol, Äther und eventuell mit Wasser gewaschen.

Bevor wir das Resultat unserer gemeinsam mit Herrn Zipperer gemachten Versuche mitteilen, haben wir zu bemerken, daß Skraup und seine Mitarbeiter sowohl beim Casein als auch bei Gelatine schon bei den unveränderten Körpern kleine Werte für OCH_3 und NCH_3 erhielten. Wir können diese Beobachtung bestätigen und noch hinzufügen, daß sich auch Serumeiweiß, Seidenfibroin und Edestin ganz ähnlich verhalten. Wir fanden folgende Werte:

	Casein	Serumeiw.	Gelatine	Edestin	Seidenfibr.
OCH_3	0,64	0,52	0,18	0,46	0,28
CH_3 an N gebunden .	1,78	1,07	1,17	1,43	1,14

Skraup und Krause fanden bei Casein . . . 0,83 OCH_3 und 1,13 CH_3
Skraup „ Böttcher „ bei Gelatine . . 0,35 „ „ 1,10 „

Den Methoxylgehalt anlangend, ist vorläufig an die Möglichkeit zu denken, daß bei einigen Präparaten Alkohol hartnäckig zurückgehalten wird. Diesbezüglich sei hervorgehoben, daß wir die Proteine selbst sowie die methylierten Proteine bei 100° so lange getrocknet haben, bis nach 24 Stunden nur eine Differenz von 0,1 bis 0,2 mg nachgewiesen werden konnte, wozu unter Umständen mehr als 100 Stunden notwendig waren. Die Art des Trocknens war, selbst wenn Konstanz des Gewichtes eintrat, nicht gleichgültig. Ein Serumeiweiß ergab bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum, bis zur Konstanz getrocknet, 1,74 % OCH_3, während es bei 100° getrocknet nur 0,64 % OCH_3 lieferte. Es ist daher leicht möglich, daß ein geringer Teil von Alkohol auch bei 100° sehr fest zurückgehalten wird.

Die bei der Bestimmung des Methylimids entstehende Menge Jodsilber dürfte wohl von den Aminosäuren herrühren. Diese Möglichkeit hat schon Skraup in Betracht gezogen und gezeigt, daß sowohl Leucin als auch Glutaminsäure, nach Herzig-Meyer behandelt, flüchtige Jodide liefern, die einen Methylimidgehalt vortäuschen können. Das Jodsilber, auf CH_3 gerechnet, ergab beim Leucin 1,45 CH_3, bei der Glutaminsäure 1,12 CH_3. Wir können noch Erfahrungen beim Glykokoll und Tyrosin hinzufügen. Nach Versuchen des Herrn Schuster lieferte Glykokoll 1,56 % und Tyrosin 1,52 % CH_3, während die Methoxylbestimmung ein rein negatives Resultat ergab. Die eben angeführten bei Aminosäuren gefundenen Zahlen (1,45; 1,12; 1,56; 1,52) stehen den Werten der untersuchten Eiweißstoffe sehr nahe.

Im folgenden sind die bei der Analyse der methylierten Stoffe nach Herzig-Meyer erhaltenen Werte angeführt. Es sei erwähnt, daß im allgemeinen die Bestimmung des OCH_3 und NCH_3 glatt vor sich ging und daß keine der erwarteten Schwierigkeiten zu konstatieren war. Die Ausscheidung in der alkoholischen Silberlösung war ziemlich weiß, und die nach Benedikt und Bamberger[1]) vorgelegte Jodcadmiumlösung zeigte nur bisweilen eine schwache Gelbfärbung.

I. Casein:

a) Nach einmaliger Behandlung mit CH_2N_2:	OCH_3	5,36 %
	CH_3 an N geb.	3,85 %
b) „ zweimaliger „ „ „	OCH_3	4,86 %
	CH_3 an N geb.	4,04 %
c) „ dreimaliger „ „ „	OCH_3	4,86 %
	CH_3 an N geb.	5,34 %

II. Gelatine:

a) Nach einmaliger Behandlung mit CH_2N_2:	OCH_3	2,99 %
	CH_3 an N geb.	3,09 %
b) „ zweimaliger „ „ „	OCH_3	3,68 %
	CH_3 an N geb.	3,72 %

III. Serumeiweiß (Pferd):

a) Nach einmaliger Behandlung mit CH_2N_2:	OCH_3	3,90 %
	CH_3 an N geb.	3,59 %
b) „ zweimaliger „ „ „	OCH_3	4,36 %
	CH_3 an N geb.	4,34 %

IV. Edestin:

a) Nach einmaliger Behandlung mit CH_2N_2:	OCH_3	2,80 %
	CH_3 an N geb.	3,22 %
b) „ zweimaliger „ „ „	OCH_3	4,05 %
	CH_3 an N geb.	4,21 %

[1]) Monatsh. f. Chem. 12, 1, 1891.

V. **Seidenfibroin:**

Nach einmaliger Behandlung mit CH_2N_2: OCH_3 . . . . 4,22 %
CH_3 an N geb. 2,77 %

Die gefundenen Werte zeigen jedenfalls, daß die Eiweißkörper sich mit Diazomethan sowohl am Sauerstoff als auch am Stickstoff mehr oder weniger leicht methylieren lassen. Die Zahlen haben im allgemeinen die Tendenz zum Steigen und die bei den bisher angewendeten Versuchszeiten erhaltenen Werte liegen meist ungefähr bei 4 bis 5 %. Da der Gehalt an OCH_3 beinahe gleich ist dem an CH_3 in der Form von NCH_3, so ist das Verhältnis von CH_3 für OCH_3 und NCH_3 beinahe wie 1 : 2. Berücksichtigt man den durchschnittlichen Prozentgehalt der Eiweißstoffe an Stickstoff und Sauerstoff, so kann man unter Anrechnung des von den nicht methylierten Verbindungen bei der Methoxyl- und Methyimidbestimmung gelieferten Jodsilbers annehmen, daß vorläufig ungefähr an jedem 5. bis 6. Stickstoff- und jedem 10. Sauerstoffatom Methylierung eingetreten ist. Einzelne kleine Widersprüche, wie z. B. beim Casein, wären noch zu eliminiern, doch kann die Aufklärung dieser Einzelheiten das Gesamtresultat wohl kaum beeinflussen. Auch die Korrektur der gefundenen Zahlen wegen des Aschengehaltes der untersuchten Substanzen fällt nicht ins Gewicht. Sie betrug im Maximum 0,25 %.

Obwohl unsere Versuche mit denen von Skraup nicht eigentlich vergleichbar sind, soll doch darauf hingewiesen werden, daß wir einen wesentlich höheren Methoxylgehalt erzielten.

		Mittel Skraup	Mittel H. u. L.
Casein	OCH_3	1,89	5,02
	CH_3 an N gebunden .	3,36	4,41
Gelatine	OCH_3	2,04	3,68
	CH_3 an N gebunden .	4,06	3,72

Für das weitere Studium der methylierten Substanzen ist es von einiger Bedeutung, daß das methylierte Serumeiweiß durch Trypsin größtenteils in Lösung gebracht, also offenbar verdaut wird.

Wir haben auch daran gedacht, den aktiven Wasserstoff nach Zerewitinoff zu bestimmen und ihn in Relation zu der Menge der aufgenommenen Methylgruppen zu setzen. Versuche in der Kälte haben bis jetzt keine klaren Resultate geliefert, offenbar wegen der Schwer- bzw. Unlöslichkeit der Eiweiß-

stoffe in Pyridin, doch wollen wir weitere Versuche, eventuell in der Wärme, anstellen, um diese Schwierigkeiten zu beheben.

Da uns aus der Klasse der Protamine kein anderes Material zur Verfügung stand, haben wir einen Versuch gemacht, bei dem ein Fehler vorauszusetzen war, nämlich die Einwirkung von Diazomethan auf Sturinsulfat[1]). Bei der Methoxylbestimmung wurde als Waschflüssigkeit eine 10%ige Lösung von Jodcadmium vorgelegt, und wir haben dadurch erreicht, daß trotz der starken Entwicklung von Schwefelwasserstoff der Niederschlag in der Silberlösung ganz weiß gefärbt war. Trotzdem haben die Zahlen für OCH_3 nach der Untersuchung von Benedikt und Bamberger[2]) nur einen qualitativen Wert, weil durch die Bildung von Methylmercaptan Verluste entstehen, so daß der Wert für OCH_3 wahrscheinlich zu klein ist. Entfernt man nach der Methoxylbestimmung, wie von Herzig-Meyer vorgeschrieben, die Jodwasserstoffsäure aus dem zweiten Kölbchen und dem Ansatzrohr, dann geht die Methylimidbestimmung glatt vor sich. Es bildet sich kein Schwefelcadmium mehr und die Ausscheidung in der Silberlösung ist rein weiß. Die Bestimmung des an N gebundenen CH_3 kann daher nach den bisherigen Erfahrungen als eine normale gewertet werden.

Sturinsulfat bei 100° bis zur Konstanz getrocknet	OCH_3	0,31%
	CH_3 an N geb. .	1,71%
1 mal mit CH_2N_2 behandeltes Sturinsulfat (100° trocken)	OCH_3	2,91%
	CH_3 an N geb. .	7,91%

Es fällt auf, daß die Zahl für an N gebundenes CH_3 hier bei nur einmaliger Behandlung des Sturinsulfates beträchtlich höher ist, als bei den anderen von uns untersuchten Proteinen, wobei noch der beträchtliche Gehalt an Schwefelsäure zu berücksichtigen ist. Diese Beobachtung scheint die Ansicht von Skraup sowie von Rogoziński zu bestätigen, daß die Diaminosäuren der Methylierung verhältnismäßig leicht unterliegen.

Zur Abgrenzung des Wirkungsbereiches des Diazomethans haben wir weiterhin das käufliche Witte-Pepton dieser Einwirkung unterworfen.

---

[1]) Von Herrn Prof. Kossel vor längerer Zeit gütigst überlassenes Präparat.

[2]) l. c.

Pepton bei 100° getrocknet . . . . OCH_3 . . . . 0,52 %
CH_3 an N geb. 1,62 %
a) 1 mal mit CH_2N_2 behandeltes Pepton bei 100° getr. OCH_3 . . . . 3,29 %
CH_3 an N geb. 5,17 %
b) 3 mal „ „ „ „ „ „ „ OCH_3 . . . . 4,18 %
CH_3 an N geb. 6,74 %

Bei Peptiden haben wir nur einen Versuch mit einer kleinen Menge Triglycylglycin ausgeführt. Da das mit Diazomethan behandelte Präparat anscheinend das Trocknen bei 100° nicht verträgt, haben wir beide Substanzen, die ursprüngliche und die mit CH_2N_2 behandelte, im Vakuum über Chlorcalcium bis zur Konstanz getrocknet.

Das nicht behandelte Präparat ergab . . . . . OCH_3 . . . . . 0,42 %
CH_3 an N geb. . 1,80 %
Das 1 mal mit CH_2N_2 behandelte Präparat ergab OCH_3 . . . . . 5,42 %
CH_3 an N geb. 10,28 %

Die Einwirkung ist also eine bedeutende. Versuche mit einer größeren Menge und mit wiederholter Einwirkung von Diazomethan sind im Gange.

Über die Methylierung am Stickstoff mit Hilfe von Diazomethan liegen schon Beobachtungen von Pechmann, Hans Meyer und anderen Forschern vor. Die für die Eiweißverbindungen in Betracht kommenden Aminosäuren sind in dieser Weise, soweit wir wissen, nicht untersucht worden, wenn auch Methylierungen nach anderen Methoden in großer Zahl schon ausgeführt worden sind. Vorläufige gemeinsam mit Herrn Schuster ausgeführte Versuche ergaben einzelne erwähnenswerte Resultate. Alanin, Leucin und Glykokoll reagieren unter Gasentwicklung. Die Untersuchung der Einwirkungsprodukte ist im Gange. Hippursäure gibt glatt den schon bekannten Methylester vom Schmelzpunkt 75° und zunächst nur eine sehr schwache Methylierung am Stickstoff. Tyrosin blieb teilweise unverändert, aber der in Reaktion getretene Anteil ist in rohem Zustande ein in Alkohol leichtlösliches Öl, das zwei Methoxylgruppen neben einer Methylgruppe am Stickstoff zu enthalten scheint.

Bildung von Milchzucker aus Lävulose durch Blutserum, das nach parenteraler Zufuhr von Rohrzucker gewonnen wurde.

Von

F. Röhmann und T. Kumagai.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts zu Breslau.)

(Eingegangen am 12. März 1914.)

In der Arbeit von T. Kumagai[1]), in der das Auftreten von Invertin im Blute nach der parenteralen Zufuhr von Rohrzucker näher untersucht wurde, war die Beobachtung mitgeteilt worden, daß gewisse Sera nicht nur den Rohrzucker spalten, sondern auch seine Spaltungsprodukte weiter umwandeln. Aus Dextrose entstehe Lävulose, aus Lävulose bilde sich ein Disaccharid. Im folgenden soll gezeigt werden, daß dieses Disaccharid Milchzucker ist.

Es wurden folgende Präparate untersucht.

Präparat I. 19. V. 1913. 100 ccm Serum von einem passiv immunisierten Hunde werden mit 100 ccm 5%iger Lävuloselösung in den Brutschrank gestellt.

Am 19. V. werden 2 ccm mit Wasser auf 10 ccm verdünnt und enteiweißt. $\alpha - 20'$.

Am 23. V. ebenso verfahren. $\alpha + 45'$.

190 ccm des Serumzuckergemisches werden nun mit 200 ccm Wasser verdünnt und mit 37 ccm $^n/_{10}$-Schwefelsäure versetzt, so daß rotes Lackmoidpapier kaum noch gebläut wird. Dann wird das Eiweiß auf dem Wasserbade durch Erhitzen koaguliert und abfiltriert. Das Filtrat, 375 ccm, dreht im 1-dcm-Rohr $+ 2^\circ\ 10'$. Es wird auf dem Wasserbad eingedampft und der Sirup mit Methylalkohol versetzt. Der Methylalkohol wird verdunstet und noch mehrmals unter Verdunsten Methylalkohol hinzugegeben, bis sich krystallinische Massen auszuscheiden beginnen. Nach dem Erkalten werden sie abgesaugt und mit Methylalkohol ausgekocht, bis eine Probe beim Erhitzen mit essigsaurem Phenylhydrazin kein Glykosazon mehr gibt. Ausbeute 9,6 g. Der Zucker wurde aus Wasser umkrystallisiert.

---

[1]) Diese Zeitschr. 57, 380, 1913.

Präparat II. Am 27. X. 1913 werden 15 ccm Serum, das von einem mit Rohrzucker vorbehandelten Kaninchen stammte, mit 15 g Lävulose, 100 ccm Wasser und 0,75 ccm Toluol in den Brutschrank gestellt.

Am 29. X. wird 1 ccm mit Wasser auf 10 ccm verdünnt und mit essigsaurem Eisen enteiweißt; α — 10′, Glucosazon, reichlich Lactosazon.

Am 1. XI. ebenso verfahren; α + 28′, Glucosazon und überwiegend Lactosazon.

Am 6. XI. ist das Gemisch gleichmäßig milchig opalescent; es reagiert auf Lackmus ganz schwach sauer. 1 ccm auf 10 ccm verdünnt, enteiweißt; α + 30′, Glucosazon, überwiegend Lactosazon.

Am 8. XI. wird die Flüssigkeit mit einer sehr kleinen Menge verdünnter Essigsäure versetzt, so daß sie auf Lackmus schwach sauer reagiert, und auf kochendem Wasserbade erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das klare Filtrat auf dem Wasserbade eingeengt, bis sich der Zucker auszuscheiden beginnt. Dann wird mit etwas Alkohol angerührt und zur Krystallisation stehen gelassen. Am folgenden Tag wird der Zucker abgesaugt und mit 50%igem Alkohol gewaschen. Weißes, körnig krystallinisches Pulver. Ausbeute 13,2 g.

Präparat III. Am 11. VIII. 1913 werden 284 ccm Blutserum von einem „passiv immunisierten" Hunde mit 60 ccm einer ca. 50%igen Lävuloselösung gemischt. Eine Probe wird auf das Dreifache verdünnt und mit essigsaurem Eisen enteiweißt. α — 1° 12′.

Am 29. VIII. dreht eine entsprechend behandelte Probe + 1° 10′. Die Gesamtflüssigkeit wird wie bei Präparat I weiter behandelt. Der Zucker wird aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert.

Präparat IV. Lävulose (?) wird im August 1913 unter Zusatz von Toluol mit „Gesamtblut vom Hunde" aufgestellt, am 12. XI. mit Alkohol gefällt. Filtrat eingeengt, mit Alkohol gefällt. Fällung unter Erwärmen in Wasser gelöst und mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt. Beim Stehen in Eiswasser scheidet sich der Zucker ab. Er wird aus verdünntem Alkohol und noch einmal aus Wasser umkrystallisiert.

Präparat V vom 21. VII., von T. Kumagai hergestellt. Weißes krystallinisches Pulver, nur als „Disaccharid" bezeichnet.

Der durch Einwirkung des Rohrzuckerserums auf Lävulose erhaltene Zucker löst sich wie der Milchzucker ziemlich leicht in Wasser und läßt sich aus der wässerigen Lösung leicht durch Alkohol fällen. Läßt man ihn neben Milchzucker aus Wasser krystallisieren, so gleichen sich die Krystallmassen anscheinend vollkommen. Aus Wasser krystallisiert der Zucker mit 1 Mol. H_2O.

Präparat I. 0,7255 g eine Stunde auf ca. 105° erhitzt. Gewichtsabnahme 0,0383 g, d. h. 5,24%; für $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$ ber. 5,0%.

Präparat IV verliert beim Trocknen auf 100 bis 110° 4,13%.

Käuflicher Milchzucker aus Wasser umkrystallisiert und getrocknet, zersetzt sich bei 205°. Präparat III zersetzte sich bei 205 bis 206°, Präparat IV bei 203°.

Die Elementaranalyse ergab:

Präparat I für $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$

ber. 40,1% C, 6,67% H
gef. 40,8% C, 6,9% H.

Das Molekulargewicht für wasserfreien Milchzucker ist 342. Es wurde bei Präparat I bestimmt:

0,1465 g mit Wasser in 10,57 ccm Δ 0,075°. M. = 347,
0,2215 g " " " 10,57 " Δ 0,108°. M. = 342.

Das Drehungsvermögen des krystallwasserhaltigen Milchzuckers, frisch gelöst, ist + 85° bis + 90°. Es sinkt allmählich auf $[\alpha]_D^{20}$ + 55,3°, auf wasserfreien Zucker berechnet. Wir beobachteten folgendes:

Präparat IV. 1,498 g innerhalb einer Stunde mit Wasser zu einem Volumen von 14,9 ccm gelöst, α im 1-dcm-Rohr + 6° 52′, nach 24 Stunden 5° 7′, $[\alpha]_D$ + 51°.

Präparat V. 0,3191 g in 14,48 ccm, α im 2-dcm-Rohr nach 24 Stunden 2° 24′ $[\alpha]_D$ + 54,5.

Der Zucker reduziert alkalische Kupferlösung; er gärt nicht mit „Preßhefe“.

Beim Erhitzen mit essigsaurem Phenylhydrazin bildet er ein in Wasser lösliches Osazon, das in Kugeln krystallisiert, über deren Ränder sehr feine dünne Nadeln hervorragen.

Osazonpräparat I. 1 g des Zuckers wird in 50 ccm Wasser gelöst und mit 2 g Phenylhydrazin und 2 ccm 50%iger Essigsäure 1½ Stunden im Wasserbade erhitzt. Erst nach dem Erkalten scheidet sich ein schwefelgelber Krystallbrei ab. Er wird abgesaugt, in einer geringen Menge Alkohol ohne Erwärmen gelöst und durch Zusatz von Wasser wieder ausgefällt. Lösung und Fällung werden noch zweimal wiederholt. Dann wird der Niederschlag im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Er färbt sich hierbei bräunlich, Schmelzpunkt 196°.

Für $C_{12}H_{20}O_9(N_2H_2 . C_6H_5)_2$	ber.	gef.
	N 10,77	11,0
	C 55,4	55,4
	H 6,3	6,5

Die Untersuchung der bei der Hydrolyse entstehenden Produkte ergab, daß die Hälfte des Disaccharids aus d-Glucose besteht.

Präparat IV. 0,3927 g werden in 25 ccm mit 0,5 ccm konz. Schwefelsäure 3 Stunden im kochenden Wasserbad erhitzt. Dann wird mit $CaCO_3$ neutralisiert, filtriert, gewaschen, eingeengt, auf 15 ccm aufgefüllt. Die Lösung enthält also 2,6% Zucker. α im 1-dcm-Rohr + 1,45°. Im

Lohnsteinschen Apparat vergärt innerhalb 6 Stunden nur 1%, am folgenden Tage sind 1,8% „Traubenzucker" vergoren.

Ein anderes Präparat wird mit 3% H_2SO_4 7 Stunden im kochenden Wasserbade erhitzt. Die Lösung hat sich gelb gefärbt, mit $CaCO_3$ neutralisiert, mit Kohle entfärbt. Eine Probe wird mit essigsaurem Phenylhydrazin erhitzt; nach dem Abkühlen neben typischem Glucosazon Kugeln, die aus schmalen, schwefelgelben Plättchen bestehen. α im 2-dcm-Rohr + 2° 9′ = 2,1% Glucose. Eine Probe wird im Lohnsteinschen Apparat vergoren. Nach 2 Stunden 1,2% „Traubenzucker".

Eine andere Probe derselben Zuckerlösung mit konz. H_2SO_4 3 Stunden im kochenden Wasserbade erhitzt, mit $CaCO_3$ neutralisiert. α im 1-dcm-Rohr + 43′ = 1,3% Glucose, im Lohnstein 0,5 bis 0,6% Glucose.

Präparat III. 3 g in 50 ccm Wasser mit 1 ccm konz. H_2SO_4 6 Stunden im kochenden Wasserbade erhitzt, mit 2 g $CaCO_3$ und dem doppelten Volumen Alkohol, abgesaugt, Alkohol verdunstet, durch vorsichtiges Abdampfen mit Wasser entfernt. Mit 2 g Hefe 6 Stunden bei 27°, dann bis zum folgenden Tage bei Zimmertemperatur; mit essigsaurem Blei gefällt, Filtrat vom Schwefelblei mit H_2S entbleit eingeengt.

Vol. 15 ccm. α im 1-dcm-Rohr + 5° 52′ = 7% = 1,05 g Galaktose. Von der auf das 10fache verdünnten Lösung reduzieren 8 ccm 10 ccm Fehlingsche Lösung.

Osazon: Sterne und Garben, die aus schmalen langen, schwefelgelben Plättchen bestehen.

Wie der Milchzucker liefert auch unser Zucker bei der Oxydation mit Salpetersäure Schleimsäure.

Präparat II. 2,637 g werden mit 30 ccm konz. Salpetersäure im kochenden Wasserbad erhitzt und die Flüssigkeit eingeengt. Schon während des Erhitzens scheiden sich krystallinische Massen aus. Die eingeengte Flüssigkeit wird mit etwas Wasser verdünnt; sie bleibt bis zum folgenden Tag stehen. Die Krystalle werden unter Waschen mit Wasser auf einem gewogenen Asbestfilter gesammelt. Ausbeute 0,9518 g. Die Schleimsäure wird in verdünnter Natronlauge gelöst und mit Salpetersäure wieder gefällt, gewaschen und getrocknet. Schmelzpunkt 215 bis 217°. Eine Probe mit Ammoniak abgedampft, trocken erhitzt, rötet einen mit Salzsäure befeuchteten Fichtenspan.

2,5 g von verschiedenen anderen Präparaten werden in derselben Weise mit konz. Salpetersäure behandelt. Ausbeute mehr als 0,31 g. Schmelzpunkt 215 bis 216°. Säurezahl 37,9 (ber. 38,1). Optisch inaktiv. Pyrrolreaktion.

Durch Brom läßt sich auch unser Zucker zur Galaktosidogluconsäure[1]) oxydieren.

Präparat II. 10 g Zucker werden mit 70 ccm Wasser und 3 g Brom 4 Tage unter wiederholtem Schütteln bei Zimmertemperatur stehen ge-

[1]) E. Fischer und J. Meyer, Ber. 22, 362, 1889. — O. Ruff-Ollendorf, Ber. 33, 1806, 1900. — C. Neuberg, diese Zeitschr. 24, 162, 1910.

lassen. Das überschüssige Brom wird unter vermindertem Druck möglichst abgesaugt, die in Eis gekühlte Flüssigkeit mit $CaCO_3$ im Überschuß versetzt und zur völligen Zerstörung des Broms Schwefelwasserstoff eingeleitet, bis eben Entfärbung eingetreten ist. Man filtriert, engt im Vakuum ein und fällt mit Alkohol. Der Niederschlag wird noch einmal in Wasser gelöst und mit dem doppelten Volumen Alkohol gefällt.

A. Der Niederschlag wird in Wasser gelöst, der Alkohol auf dem Wasserbade durch vorsichtiges Abdampfen entfernt und filtriert. Die Lösung reduziert nicht, ist bromhaltig.

Eine Probe wird nach Zusatz einiger Tropfen konz. H_2SO_4 1 Stunde im kochenden Wasserbade erhitzt, mit $CaCO_3$ neutralisiert und filtriert. Sie reduziert stark und gibt beim Erhitzen mit essigsaurem Phenylhydrazin kein Glucosazon, sondern ein Osazon, das unter dem Mikroskop große schmale, abgestumpfte, z. T. gekreuzte, z. T. ähnlich dem Glucosazon gelagerte dünne gelbe Plättchen zeigt.

Die Hauptmenge wird mit der berechneten Menge Ag_2O versetzt, wobei die entstehende alkalische Reaktion durch Essigsäure beseitigt wird. Auf Grund einer Kalkbestimmung wird die berechnete Menge Oxalsäure zugesetzt, das Filtrat auf dem Wasserbad eingeengt und mit Alkohol gefällt.

Die Fällung wird in Wasser gelöst und mit einem Überschuß von $CaCO_3$ im kochenden Wasserbade behandelt, filtriert, eingeengt, mit Alkohol gefällt, im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet und zerrieben; weißes trockenes Pulver.

0,1987 g liefern 0,0168 g CaO, i. e. 6,04 % Ca;

für $(C_{12}H_{21}O_{12})_2Ca$ berechnet . . . 5,31 % Ca.

0,6844 g in 14,5 ccm Wasser. α im 1-dcm-Rohr + 1° 4′. $[\alpha]_D$ + 22,6°.

Das entsprechend aus käuflichem Milchzucker dargestellte Kalksalz enthielt 5,23 % Ca und drehte + 25,4°. Dem vorhergehenden Präparate war vermutlich noch etwas essigsaurer Kalk beigemengt.

B. Aus dem Filtrat scheiden sich beim Stehen harte krystallinische Massen ab. Sie werden abfiltriert, mit verdünntem Alkohol (2 Vol. 94 %iger Alkohol und 1 Vol. Wasser) gewaschen, abgepreßt und im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Beim Trocknen auf 110° verlieren sie 6,07 % H_2O.

Für $(C_{12}H_{21}O_{12})_2Ca.CaBr_2$ berechnet . . . 16,75 % Br, 8,4 % Ca;

auf Trockensubstanz berechnet gefunden 16,60 % Br, 8,8 % Ca.

0,3621 g, in Wasser gelöst zu 14,5 ccm, drehen im 1-dcm-Rohr 21′, auf Trockensubstanz berechnet $[\alpha]_D$ + 14,9°.

Es hatte sich also ein Doppelsalz von galaktosidogluconsaurem Calcium mit Calciumbromid gebildet. Dasselbe Doppelsalz wird unter denselben Bedingungen wie oben beschrieben aus Milchzucker gewonnen. Aus ihm besteht schon der durch Alkohol erzeugte Niederschlag A. Es läßt sich auch aus dem bromfreien Calciumsalz gewinnen, wenn man es mit einer Calciumbromidlösung in gewissen Konzentrationsverhältnissen mischt und mit Alkohol fällt. Aus entsprechend verdünntem Alkohol läßt es sich krystallinisch gewinnen.

Über Eiweißfällung durch Eiweiß.

Von

Beth af Ugglas.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 12. März 1914.)

Seitdem Miescher 1874 das Protamin in den Spermatozoen des Rheinlachses gefunden hat, und besonders seitdem Kossel[1]) 1894 dessen Fähigkeit entdeckt hat, sich mit anderen Eiweißkörpern zu einer Verbindung „mit allen Eigenschaften eines Histons" zu vereinigen, ist diese Substanz mehrfach bearbeitet worden. Kossel[1]) war ursprünglich der Ansicht, daß das Protamin den Kern aller Eiweißkörper bildete, indem er sich auf das Verhältnis bei der Eiweißspaltung stützte. Nachdem man die eine nach der anderen Gruppe von dem Eiweiß abgespalten hat, sollte nämlich ein Rest bleiben, der bei allen Eiweißkörpern wesentlich aus denselben basischen Stoffen, Diaminosäuren, bestände. Dieselben basischen Stoffe werden aus reinem Protamin nebst einer geringen Menge von Monoaminosäuren gewonnen. Eine der am meisten charakteristischen Eigenschaften des Protamins, nämlich Eiweiß ausflocken zu können, wurde von Kutscher[2]) und Bang[3]) bei gewissen Stoffen in Witte-Pepton, bei einem Spaltungsprodukt des Fibrins, des Caseins und des Histons ebenfalls gefunden. Die späteren Untersuchungen Kossels[4]) haben indessen gezeigt,

---

[1]) Kossel, Deutsche med. Wochenschr. 7, 1899. Zitiert nach Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 178, 1896/97.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 117, 1897.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 483, 1899.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 49, 308, 1906.

daß das Spaltungsprodukt des Histons mit dem Protamin nicht identisch sein kann, obwohl es auch andere Ähnlichkeiten gibt (Fällung durch die Alkaloidreagenzien bei neutraler Reaktion). Weiter haben Kossel und Dakin[1]) gefunden, daß das Molekulargewicht des Protamins etwa von derselben Größenordnung wie das der übrigen Eiweißkörper sein muß, mindestens zwischen 2 bis 3,000. Man nimmt demgemäß nicht mehr an, daß das Protamin eine kernbildende Rolle für die mehr komplizierten Eiweißkörper spiele; und man weiß nicht, ob ein der Eiweißfällung des Protamins analoger Vorgang in der Natur vorkommt. Man weiß sogar nicht, ob die durch Protamin erzeugte Eiweißfällung überhaupt eine chemische Verbindung zwischen Protamin und Eiweiß ist, oder ob es sich hier um eine Adsorptionserscheinung handelt. Da die Frage nach der Art dieses Phänomenes von allgemeiner physiologischer Bedeutung ist — so ist z. B. die Fällung der Präcipitine durch Eiweiß vermutlich eine gleichartige Reaktion —, so habe ich als Beitrag zur Lösung dieser Frage und auf Veranlassung von Herrn Prof. I. Bang einige durch Protamin erzeugte Niederschläge von Eiweiß studiert und mit entsprechenden Niederschlägen durch Histon und Casein[2]) verglichen, um zunächst das Verhältnis der in diese eingehenden Stoffe zu ermitteln.

Historische Übersicht.

Früher sind die Eiweißniederschläge des Protamins von Hunter[3]), die des Histons von Malengreau[4]) studiert worden.

Hunter geht von der von Kossel gefundenen Eigenschaft des Protamins aus, durch Pepsin nicht gespalten zu werden. Im Gegensatz hierzu wird das mit dem Protamin vereinigte Eiweiß durch Pepsin abgetrennt und weiter bis zu Albumosen und Peptonen gespalten. Hunter behauptet, daß das Protamin mit den Spaltungsprodukten nicht nur keinen Niederschlag bewirkt, sondern auch keine lösliche Verbindung mit diesen Spaltungsprodukten eingeht, was durch das Verhalten des Protamins zu Witte-Pepton gestützt wird. Dieser Verfasser bestimmt den Stickstoffgehalt der durch Digestion der Fällung mit Pepsin er-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 407, 1904.

[2]) Casein wirkt eiweißfällend nach Privatmitteilungen von Prof. Bang.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 526, 1907.

[4]) La Cellule 21, 121, 1903.

haltenen Lösung und korrigiert für den Stickstoffgehalt des angewandten Pepsins. Er schlägt dann das Protamin durch Natriumpikrat bei schwach alkalischer Reaktion nieder, bei welcher Reaktion nach Hunter die entstandenen Deuteroalbumosen nicht mitfallen, das Protamin hingegen quantitativ gefällt wird. Das niedergeschlagene Protamin wird dann durch Zusatz von Schwefelsäure und Extraktion der Pikrinsäure mit Äther in das lösliche Sulfat umgewandelt, und der Gehalt der Lösung an Protaminsulfat durch Stickstoffanalyse bestimmt. Die Reinheit des Protamins wurde durch die Millonsche Reaktion, die Schwefelblei- und Glyoxylreaktionen, die sämtlich negativ ausfallen, geprüft. Diese Methode ist jedoch nicht ganz einwandfrei. Es ist denkbar, daß während der Digestion Spaltungsprodukte entstehen, die im Gegensatz zu Witte-Pepton mit Protamin sich verbinden können und dadurch von einer weiteren Pepsineinwirkung geschützt werden, und daß diese Verbindung durch Natriumpikrat mitgefällt wird. Wäre dies der Fall, so müßte die Analyse einen zu hohen Protaminwert ergeben. Weiter wird das Protamin nur, wenn die alkalische Reaktion äußerst schwach ist, quantitativ gefällt, und schon bei neutraler Reaktion beginnen die Albumosen zu fallen. Man muß also mit größter Genauigkeit diejenige Hydroxylkonzentration treffen, bei der die Albumose nicht, das Protamin aber quantitativ gefällt werden.

Malengreau hat die Fällung von Serumalbumin und Globulin durch Histon quantitativ untersucht. Er bestimmt den Gehalt seiner Histonlösung durch Stickstoffanalyse, fällt durch Zusatz von Eiweiß im Überschuß, wägt den abzentrifugierten Niederschlag zusammen mit der Mutterlauge, bestimmt den Stickstoffgehalt der gewogenen Menge, korrigiert für den Stickstoffgehalt der Flüssigkeit und hat also das Verhältnis Histonstickstoff : Niederschlagstickstoff erhalten, vorausgesetzt, daß das Histon quantitativ gefällt worden ist. Freilich hat dieser Verfasser das Zentrifugat auf freies Histon qualitativ geprüft und kein Histon mehr gefunden, er hat aber einen Überschuß an Eiweiß angewandt, wodurch bekanntlich der Niederschlag gelöst wird; bei meinen Histon-Eiweißfällungen in Eiweiß gelöst, findet man die empfindlichste Histonreaktion (Fällung durch Alkaloidreagenzien bei schwach alkalischer Reaktion) nicht wieder. Bei einem großen Überschuß an Eiweiß muß auch eine große Menge Ammoniak zugesetzt werden, um eine Fällung zu bewirken. Es ist also möglich, daß das erhaltene Verhältnis zwischen Histon und der durch dasselbe bewirkten Fällung zu groß ist. Ferner ist die Korrektion für den Stickstoffgehalt der Mutterlauge, deren Volumen schwer zu ermitteln sein muß, sehr willkürlich. Ich habe, um derartige Schwierigkeiten zu vermeiden, die zwei Eiweißkörper Casein und Hämoglobin für meine Untersuchungen gewählt. In dem ersten geht nämlich Phosphor, in dem zweiten Hämatin ein, von welchen Protamin und Histon frei sind. Durch eine Phosphoranalyse oder eine Hämatinbestimmung, die sich rasch und bequem ausführen lassen, kann das Verhältnis der eingehenden Stoffe ermittelt werden.

Herstellung des Ausgangsmaterials.

I. Herstellung des Protamins.

Das von mir angewandte Protamin ist Clupein und wurde nach Kossel[1]) hergestellt, jedoch nicht durch Pikrinsäure sondern nur mehrmals durch Alkohol gefällt, bis es eine reinweiße nicht klebrige Beschaffenheit annahm. Danach wurde es mit Äther gewaschen und bei 90° getrocknet:

Die Analyse ergab:

	Direkt %	Auf aschefreie Substanz berechnet %	Nach Kossels Angaben %
N	23,4 (Kjeldahl)	24,0	25,0
H_2SO_4 . .	20,5	21,1	21,0
Asche . .	2,34	—	—

Zur weiteren Reinigung und besonders um das Präparat von unorganischen Bestandteilen zu befreien, wurde das Clupeinsulfat in warmem Wasser gelöst und die Lösung darauf bis 0° abgekühlt, wobei praktisch alles Protamin sich als ein wasserhaltiges Öl auf dem Boden des Gefäßes sammelte. Das Öl wurde mit Alkohol zu einem feinen, weißen Pulver zerrieben und bei 100° getrocknet.

Die Analyse ergab jetzt:

N . . . 24,4%
Asche . . 0,45%

Das Protamin wurde nochmals gelöst, und, weil Bang u. a. Histon in den unreifen Testikeln von Fischen gefunden haben, die Lösung mit Ammoniak versetzt, um eventuell anwesendes Histon abzuscheiden. Dabei wurde ein geringer Niederschlag beobachtet, die Lösung wurde filtriert, mit Alkohol so oft gefällt und wieder in Wasser gelöst, bis keine alkalische Reaktion im Alkohol bemerkbar war. Dann wurde ein Tropfen Schwefelsäure der Lösung zugesetzt, diese abgekühlt, das ausgeschiedene Öl wie vorher behandelt, und das Pulver bei 100° getrocknet.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **22**, 178, 1896/97; **25**, 165, 1898.

Die Analyse ergab:

N . . . 24,4 %,

bei 120° getrocknet:

N . . . 24,6 %,

H_2SO_4 . 20,4 %.

Verunreinigung durch Phosphor: 0,16 %.

II. Herstellung des Histons.

Um das Histon (Thymushiston) herzustellen, wurde zuerst Nucleohiston nach Bang[1]) hergestellt. Dieses wurde durch Salzsäure gespalten und das Histonchlorid wurde durch wiederholtes Fällen mit Ammoniak und Lösen in Schwefelsäure von Spuren von Nucleinsäure und von Parahiston, das nicht durch Ammoniak fällbar ist, befreit.

Diese Herstellung erwies sich indessen für meinen Zweck nicht besonders geeignet. Bei der Spaltung des Nucleohistons scheidet sich nämlich die Nucleinsäure in zähen, voluminösen Flocken ab, die das Histon zum großen Teil mitreißen, und von denen es schwer zu befreien ist. Weiter ist das aus der Histonchloridlösung durch Ammoniak gefällte Histon zwar anfangs in Schwefelsäure leicht löslich, wird aber mit steigender Reinheit schwer- bzw. unlöslich, und auch dadurch ist ziemlich viel Material verloren gegangen. Den Umstand, daß Histon-Niederschläge erst leicht löslich in Säuren sind und bei wiederholten Fällen diese Eigenschaft verlieren, habe ich mit dem später erwähnten Verhalten der Histon-Eiweißfällung in Zusammenhang gebracht. Diese Fällung, in Säuren gelöst, läßt sich durch Ammoniak wieder fällen. Dieser Niederschlag ist, wie die ungereinigte Histonfällung, in Säuren leicht löslich, und es ist wahrscheinlich, daß das Parahiston, ehe es vollständig entfernt ist, für die Löslichkeit des Histons dieselbe Rolle spielt wie das zugesetzte Eiweiß.

Wegen dieser Schwierigkeiten habe ich später eine andere Methode angewandt.

Wasserextrakt aus Thymus wurde mit Calciumchloridlösung gefällt. Die Fällung, die löslich in Wasser und im Überschuß von Calciumchlorid ist, wurde mit calciumchloridhaltigem Wasser durch Zentrifugierung so lange gewaschen, bis das Zen-

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 135, 1903.

trifugat keinen Niederschlag mehr mit Essigsäure gab. Ein zweites im Wasserextrakt aus Thymus befindliches Nucleoproteid, das leicht mit Essigsäure fällbar ist, wird nach Huiskamp[1]) und Bang[2]) nicht durch Calciumchlorid gefällt und kann also ausgewaschen werden. Der gewaschene Niederschlag wurde ca. 1 Stunde mit Schwefelsäure geschüttelt und danach filtriert. Das Filtrat war klar und enthielt große Mengen Histonsulfat. Nochmaliges Ausschütteln des Niederschlages erwies sich nicht lohnend. Das Histon wurde durch Kochsalz oder Alkohol aus dem Filtrat gefällt, und mit dem Fällungsmittel so lange gewaschen, bis das Filtrat die Biuretreaktion nicht gab, und das Parahiston folglich entfernt war. Da die Angaben über die Fällbarkeit des Parahistons durch Alkohol variieren, habe ich die gewaschene Alkoholfällung, um sie auf Parahiston zu prüfen, gelöst und wieder mit Kochsalz gefällt. Das Parahiston wird dadurch sicher nicht niedergeschlagen. Das Filtrat wurde mittels der Biuretreaktion auf Parahiston geprüft und völlig frei davon gefunden.

Die wässerige Lösung der Alkohol- oder Kochsalzfällung des Histons wurde jetzt gegen destilliertes Wasser dialysiert, um es von Kochsalz, überschüssiger Säure und Calciumsalz zu befreien. Das Calciumsulfat konnte aber aus der Lösung nur sehr langsam entfernt werden, weshalb ein wenig Salzsäure zugesetzt werden mußte. Die noch schwach saure Lösung wurde zum Herstellen meiner Präparate verwendet.

Ich hatte vorher versucht, meine Histonsulfat-Präparate als Pulver nach Trocknen mit Alkohol und Äther aufzubewahren. Kurz nach dem Trocknen waren sie in Wasser leicht löslich. Einige Tage nachher aber unlöslich. Ich schlug jetzt einen Teil meiner Histonlösung durch Alkohol nieder und ließ die Fällung unter Alkohol stehen. Sie behielt jetzt ihre Löslichkeit gut bei. Eine Probe war nach Monaten noch in Wasser leicht löslich.

Die Analysen zweier Präparate ergaben:

	I.	II.	
N . . .	17,8 %	18,3 %	(Kjeldahl).

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 145, 1901.

[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 115, 1903.

Nach Bangs[1]) Angaben 18,3 %.

Verunreinigung durch Phosphor, der Analyse eines Präparates zufolge: 0,2 %.

III. Herstellung des Caseins.

Die Herstellung des Caseins geschah nach Hammarsten. Verdünnte Milch wurde durch Essigsäure niedergeschlagen, durch Dekantation und Filtration gewaschen und in schwachem Alkali gelöst. Um die Lösung vom Fett zu befreien, wurde sie mit Kieselgur geschüttelt und filtriert. Sie war jetzt klar, opalescent und ein wenig gelb gefärbt. Das Casein wurde nochmals gefällt, gewaschen und gelöst. Vor dem Gebrauch wurde seine Gerinnfähigkeit durch Lab konstatiert.

Das Casein wurde in vier Portionen hergestellt, an drei derselben wurden Phosphoranalysen ausgeführt. Resultate: 0,82, 0,83, 0,85 % P. Nach Hammarsten[2]): 0,85 % P.

IV. Herstellung des Hämoglobins.

Hämoglobin wurde aus defribriniertem Pferdeblut hergestellt. Die Blutkörperchen wurden durch Zentrifugieren mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen, bis Hellers Reaktion im Zentrifugat negativ ausfiel, in 20 %igem Alkohol aufgelöst und durch Abkühlen zur Krystallisation gebracht. Die immer schön ausgebildeten Krystalle wurden durch Zentrifugieren von ihrer Mutterlauge getrennt, in Wasser gelöst, nochmals durch Alkohol in der Kälte zu Krystallisation gebracht und dieses Verfahren wiederholt. Das dritte Mal wurden die Krystalle abgesogen, zum Teil wieder gelöst, um zur Herstellung meiner Präparate zu dienen, zum Teil durch mehrmaliges Waschen mit Alkohol und Äther denaturiert und darauf bei ca. 100° getrocknet.

Analytische Methoden.

Meine analytischen Methoden waren die folgenden:

Phosphor wurde nach vorausgegangener Veraschung mit Soda und Salpeter durch Molybdänlösung gefällt und als $Mg_2P_2O_7$ gewogen.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 483, 1899.

[2]) Lehrb. d. physiol. Chem. 7. Aufl. 1910.

Hämatin wurde in Dubosqs Apparat colorimetrisch bestimmt. Eine abgewogene Menge Hämoglobin, bis zu konstantem Gewicht getrocknet, wurde in einem Reagenzrohr unter Erwärmen mit 1 ccm 20%igem Alkali und 5 ccm Wasser gelöst, in einen Meßkolben übergeführt und verdünnt, wodurch der Gehalt der Lösung genau bekannt wurde. In derselben Weise und zu gleicher Zeit wurde eine abgewogene Menge des zu analysierenden Präparats, das auch bis zu konstantem Gewicht getrocknet war, behandelt. Die beiden Lösungen wurden im Colorimeter verglichen, was am leichtesten ist, wenn die Kontrollösung so eingestellt wird, daß die Farbe rein grün ist. Die Einstellung ist dann sehr scharf. Bei einer solchen Konzentration, daß die grüne Farbe bei einer Höhe der Flüssigkeitsschicht von ca. 10 mm hervortritt, ist die Differenz zwischen den verschiedenen Einstellungen 0,1 bis 0,2 mm. Bei größerer Verdünnung werden die Variationen größer, wirken aber dann auch weniger auf die Endresultate ein. Gewöhnlich wurden zwei Bestimmungen ausgeführt, das eine Mal war die Kontrolllösung, das andere Mal die Lösung der Analysenprobe fest eingestellt. Jede Bestimmung ist das Mittel aus sieben Ablesungen.

Um die Methode zu kontrollieren und ihre Genauigkeit kennen zu lernen, habe ich Versuche ausgeführt, wobei zwei aus bekannten Mengen von denaturiertem Hämoglobin hergestellte Hämatinlösungen verglichen wurden.

Versuch	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin zur Analyse					
	Gewicht mg	Volumen ccm	Höhe der Flüssigkeitsschicht mm	Höhe der Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gewicht Hb per 100 ccm mg	Mittel mg	Abgewog. Menge Hb per 100 ccm mg	Differenz mg	Differenz %
1	84,5	50	5,1 4,5	5,9 5,3	146,0 143,4	144,8	155,0	−10,2	−6,6
2	60,5	100	5,1 6,1	4,3 5,3	71,8 69,6	70,7	72,7	−2,0	−2,7
3	47,4	100	7,1 8,2	6,3 7,3	53,4 53,2	53,3	54,6	−1,3	−2,4
4	316,8	200	5,3 5,5	5,0 5,1	167,9 170,8	169,4	166,2	+3,2	+1,9
5	273,0	100	5,3	6,6	219,2	219,2	225,9	−6,7	−3,0

Aus der vorstehenden Tabelle, in der die Kontrollversuche zusammengestellt sind, geht hervor, daß die Methode mit einem

Fehler von ca. $\pm 3\,\%$ arbeitet, wenn man die Versuche 1 ausnimmt. Die beiden Bestimmungen fallen jedoch bei diesem Versuche so genau zusammen, daß es wahrscheinlich ist, daß hier ein zufälliger Fehler vorliegt.

Bei diesen Versuchen ist die Konzentration der Kontroll- und der Analysenlösung beinahe die gleiche. Um zu erfahren, wie die Methode arbeitet, wenn die Konzentrationen sehr verschieden sind, habe ich einen Teil einer Lösung im Verhältnis 0,4 : 1 verdünnt und sie mit der ursprünglichen Lösung verglichen. Die Bestimmung gab 0,398 : 1.

Die Methode ist also offenbar für reines Hämoglobin anwendbar. Daß sie ebenso gut ist, wenn anderes Eiweiß zugegen ist, zeigen die Analysen des Casein-Hämoglobin-Niederschlages, deren Resultate ich schon hier anführen will:

Versuch	Caseingehalt, durch P-Analyse gef. %	Entsprechender Hb-Gehalt %	Hb-Gehalt, colorimetrisch gef. %	Differenz
1	33	67	69	2
2	34	66	68	2

Die Übereinstimmung zwischen dem indirekt (durch Bestimmung des Caseingehalts) und dem direkt gefundenen Hämoglobingehalt ist ja sehr befriedigend.

Oben ist erwähnt worden, daß es wichtig ist, die beiden zu vergleichenden Lösungen gleichzeitig herzustellen. Dies bedarf einer Erklärung. Zuerst habe ich eine Stammlösung bereitet und dieselbe immer zum Vergleich verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, daß man ganz andere Werte erhielt, wenn die Bestimmung an demjenigen Tage ausgeführt wurde, wo die zu analysierende Lösung bereitet war, als wenn die Bestimmung einen Tag später erfolgte. Die neubereitete Lösung wurde erst nach 3 bis 5 Tagen in bezug auf die Stammlösung konstant, und erst dann gaben die Analysen die richtigen Resultate. Die dann ermittelten Werte wichen nämlich von den theoretischen höchstens um $4\,\%$ ab; am ersten Tage aber konnte der Fehler bis zu $17\,\%$ steigen. Ich fand es bequemer, immer eine neubereitete Kontrollösung anzuwenden, anstatt darauf zu warten, bis jede zu analysierende Lösung konstant geworden war.

Der Verlauf dieser eigentümlichen Änderung der scheinbaren Konzentration der Hämatinlösung wird durch untenstehende Tabelle ersichtlich:

Zeit in Tagen	Nr. 1 0,1444 %ige Lösung Abgewogene Menge 72,2 mg			Nr. 2. 0,1084 %ige Lösung Abgewogene Menge 27,1 mg			Nr. 3. 0,1426 %ige Lösung Abgewogene Menge 142,6 mg			Nr. 4. 0,1184 %ige Lösung Abgewogene Menge 59,2 mg		
	Gef. Menge	Differenz		Gef. Menge	Differenz		Gef. Menge	Differenz		Gef. Menge	Differenz	
	mg	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%	mg	mg	%
0	82,0	+9,8	+13,5	31,9	+4,8	+17,7	164,0	+21,4	+15,0	68,5	+9,3	+17,4
1	76,4	+4,2	+5,8	—	—	—	156,0	+14,1	+10,0	63,8	+4,6	+7,7
2	—	—	—	30,5	+3,4	+12,5	152,4	+9,8	+6,9	62,3	+3,1	+5,2
3	74,2	+2,0	+2,7	29,5	+2,4	+8,9	148,2	+5,6	+3,8	63,8	+4,6	+7,7
4	71,3	−0,9	−1,2	28,9	+1,8	+6,7	152,0	+9,4	+6,6	60,0	+0,8	+1,2
5	71,3	−0,9	−1,2	28,2	+1,1	+4,1	144,0	+1,4	+1,0	61,5	+2,3	+3,9
6	—	—	—	28,0	+0,9	+3,3	146,1	+3,5	+2,6	—	—	—

Darstellung und Analyse der Fällungen.

I. Fällung des Hämoglobins.

Die Protaminfällung.

Wie bekannt, wird Eiweiß durch freie Protaminbasen, aber nicht durch die neutralen Salze derselben, gefällt. In den Protaminsulfatlösungen wurde deswegen die Protaminbase durch Alkalien in Freiheit gesetzt, um dieselbe als Fällungsmittel zu benützen. Beim tropfenweisen Zusatz der Protaminlösung zu einer starken Hämoglobinlösung entstand sofort ein flockiger dunkelroter Niederschlag, der jedoch, bevor hinreichende Mengen von Protamin zugesetzt waren, sich leicht im Überschuß des Hämoglobins wieder auflöste. Der Niederschlag setzt sich schnell ab und scheint begierig Wasser aufzunehmen, indem er in eine zähe, dickflüssige Masse übergeht. Dieselbe klebt am Boden des Gefäßes so fest, daß die darüberstehende Flüssigkeit ohne Substanzverlust abgegossen werden kann. Die Substanz wird am besten durch Reiben mit Wasser in einer Reibschale gereinigt. Nach einigen Waschungen verbleibt das Waschwasser farblos. Wird das Verreiben mit Wasser dann noch weiter fortgesetzt, so löst sich der Niederschlag allmählich mit gegen Lackmus neutraler bzw. schwach alkalischer Reaktion. Leichter tritt die Lösung ein im kohlensauren oder schwach essigsauren Wasser und außerdem, wie erwähnt, im

Überschuß von Hämoglobin. Aus dieser letzteren Lösung kann die Substanz durch Verdünnung mit Wasser oder durch Zusatz von Ammoniak wieder gewonnen werden.

Die Lösungen in Wasser bzw. in Säuren ebenso wie der dickflüssige und durchsichtige Bodensatz selbst zeigen das reine Oxyhämoglobinspektrum, wenn eine Oxyhämoglobinlösung zur Fällung verwendet wurde; dagegen das Methämoglobinspektrum, wenn Methämoglobin zur Anwendung gekommen war. Durch die gleichen Reagenzien, mit denen man reines Oxyhämoglobin in Methämoglobin überführen kann, nimmt auch eine Lösung des Oxyhämoglobin-Protamin-Niederschlags das Methämoglobinspektrum an.

Beim Kochen der Wasserlösung des Niederschlags wird das Hämoglobin koaguliert und das Protamin bleibt in Lösung. Die schwach alkalische konzentrierte Wasserlösung der Fällung gibt mit einer neutralen Natriumpikratlösung einen roten teerähnlichen Niederschlag, äußerst leicht im Überschuß des Fällungsmittels löslich. Bei dem Arbeiten mit sehr verdünnten wie mit sauren und salzhaltigen Lösungen habe ich jedoch immer einen gelben amorphen Niederschlag erhalten, der dem mit reinem Protamin entstehenden ganz ähnlich war. Ferrocyankalium gibt einen hellroten amorphen Niederschlag, Ammoniumsulfat ebenso.

Um möglicherweise die eventuelle Verbindung krystallisiert zu erhalten, habe ich den Niederschlag in kohlensäurehaltigem Wasser gelöst und die Lösung unter eine Glocke zusammen mit Natriumhydroxyd gestellt. Nach 24 Stunden konnte ein winziger Niederschlag aus gefärbten Körnchen, aber ohne krystallinische Struktur, beobachtet werden. Auf dieselbe Weise wurde eine neutrale Lösung über schwach ammoniakhaltiges Wasser gestellt und gab einen deutlich amorphen Niederschlag. Bei einem anderen Versuche wurde eine schwach saure Lösung mit Ammoniumsulfat bis zu beginnender Fällung und darauf mit wenig Wasser bis zum Verschwinden des Niederschlags versetzt und bis zu $+ 1^0$ abgekühlt. Keine Veränderung in mehreren Tagen. Bei Zimmertemperatur schied sich später eine reichliche, hellrote, aber vollkommen amorphe Fällung ab. Auch durch Alkohol und Äther habe ich auf dieselbe Weise, wie man gewöhnlich mit Pferdehämoglobin verfährt, ohne Erfolg die eventuelle Verbindung aus der Lösung des Niederschlags

zur Krystallisation zu bringen versucht. Auch reines Hämoglobin konnte daraus nicht zur Krystallisation gebracht werden. Alle Bemühungen, den zu untersuchenden Niederschlag krystallisiert zu erhalten, sind also erfolglos gewesen.

Die aus der Hämoglobinlösung erhaltene Fällung wurde zwecks Analyse in fünf Versuchen dargestellt, wobei das Verhältnis zwischen Protamin und Hämoglobin wie auch im übrigen das Verfahren beim Fällen variiert wurde. Diese Variationen wurden hauptsächlich deswegen gewählt, um sicher zu sein, daß eine eventuelle gleiche Zusammensetzung der verschiedenen Proben nicht auf der zufälligen Übereinstimmung in der Darstellung beruht. In folgendem will ich jeden Versuch ausführlich beschreiben.

I.

Protaminsulfat wurde in Wasser gelöst und mit der nach dem Schwefelsäuregehalt (20,4 %) berechneten Menge Natriumhydroxyd (auf die an der Luft getrocknete, sehr hygroskopische Substanz berechnet) versetzt. Ein Teil dieser Lösung wurde zu einer Hämoglobinlösung unter Umrühren zugetröpfelt. Die entstandene Fällung wurde durch Dekantation von der überstehenden Flüssigkeit getrennt. Diese war stark rot, d. h. das Hämoglobin war bei dem Fällen in starkem Überschuß anwesend. Ein Teil des Niederschlags war darum gelöst, und die überstehende Flüssigkeit gab mit Ammoniak noch eine Fällung. Der Hauptniederschlag wurde durch Verreiben mit Wasser, das mit 0,2 ‰ Ammoniak versetzt war, in einer Reibschale gereinigt und in zwei Teile A und B geteilt.

Analysen.

	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Protamin-Fällung					
	Gew. mg	Vol. ccm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gewicht an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %	Mittel %
Präparat A	118,1	100	8,3 7,9	10,4 10,1	94,3 92,4	147,6	150	95,8 93,9	94,9
Präparat B	118,1	101	8,3 7,9	8,5 8,1	115,3 115,2	121,8	100	94,7 94,6	94,6

A wurde mit Alkohol zu einem feinen Pulver zerrieben, mit Äther gewaschen und bei 100° getrocknet.

B wurde durch Zusatz von sehr wenig Essigsäure gelöst und durch Zusatz von so viel Ammoniak, bis die überstehende Flüssigkeit farblos geworden war, gefällt. Der Niederschlag wurde gewaschen und weiter wie der Teil A behandelt.

II.

Zu derselben Protaminlösung wie im vorigen Fall wurde eine Hämoglobinlösung zugetröpfelt, bis das Hämoglobin in ziemlich großem Überschuß zugegen war. Um diesen Überschuß zu vermindern, wurde noch ein wenig von der Protaminlösung zugesetzt. Nach Absetzen der Fällung enthielt die überstehende Flüssigkeit noch ein wenig Hämoglobin, sie war hellrot. Freies Protamin oder eine Lösung der Protamin-Hämoglobin-Fällung durch den Überschuß an Hämoglobin konnte aber darin nicht nachgewiesen werden, weder mit Natriumpikrat noch durch vorsichtigen Ammoniakzusatz. Die Fällung wurde wie Präparat I gereinigt und weiterbehandelt.

Analysen.

	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Protamin-Fällung					
	Gew. mg	Vol. ccm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gewicht an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %	Mittel %
Präparat A	67,9	100	10,3 10,6	9,8 10,1	71,4 71,3	74,9	100	95,3 95,1	95,2
Präparat B	158,0	100	10,3 7,8	13,7 10,1	118,8 122,0	125,7	100	94,6 97,1	95,9

III.

Zu einem Teil der vorher angewandten Protaminlösung wurde Hämoglobin im Überschuß rasch zugesetzt. Die ganze Fällung wurde wie der Teil A der Probe I und II behandelt.

Analysen.

Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Protamin-Fällung					
Gew. mg	Vol. ccm	Höhe der Flüssigkeitsschicht mm	Höhe der Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gewicht an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %	Mittel %
58,0	100	15,3 15,1	13,0 13,1	68,3 66,9	71,2	100	95,9 93,9	94,9

IV.

Zu einer Protaminlösung, auf dieselbe Weise bereitet wie die zum Versuche I angewandte, habe ich nur so viel Hämoglobin zugegeben, daß das Protamin die ganze Zeit im Überschuß geblieben war. Die Fällung erschien beim ersten Tropfen. Sie war von derselben Konsistenz wie vorher, doch von einer helleren Farbe. Das Dekantat, das Protamin enthielt, war ungefärbt. Die Fällung wurde wie oben gereinigt und getrocknet.

Analysen.

Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Protamin-Fällung					
Gew.	Vol.	Höhe der Flüssigkeitsschicht	Höhe der Flüssigkeitsschicht	Ber. Gewicht an Hb per 100 ccm	Abgewogene Menge	Vol.	Ber. Gehalt an Hb	Mittel
mg	ccm	mm	mm	mg	mg	ccm	%	%
100,3	100	10,3 9,2	19,4 18,1	53,2 51,0	69,4	100	76,7 73,5	75,1

V.

Eine Protaminsulfatlösung wurde mit der Hälfte der wie oben berechneten Menge Natronlauge versetzt. Zu dieser Lösung wurde so viel Hämoglobin zugesetzt, bis die Flüssigkeit eben rot wurde und keine weitere Fällung bei weiterem Hämoglobinzusatz gab. Die hierbei entstandene Fällung (A) wurde wie die vorher erwähnten Präparate gewaschen und getrocknet. Ihr annäherndes Gewicht war 0,35 g.

Dem rotgefärbten Dekantat wurde eine Probe entnommen. Diese gab mit den Alkaloidreagenzien, mit Ammoniak und mit einer alkalischen Protaminlösung einen Niederschlag. Die Hauptmenge des Dekantats wurde jetzt mit Ammoniak gefällt; nach dem Absetzen der so gewonnenen Fällung war die Flüssigkeit farblos, gab aber die Protaminreaktionen. Darum wurde mehr Hämoglobin hinzugesetzt, wobei eine ausgiebige Fällung entstand. Hämoglobin und Ammoniak wurden jetzt in kleinen Portionen abwechselnd zugesetzt, wodurch ich den Punkt erreichen konnte, wo die Flüssigkeit ungefärbt war und auch keine Protaminreaktionen mehr gab, also weder Protamin noch Hämoglobin mehr enthielt. Die ganze aus dem Dekantat des Niederschlags A entstandene Fällung (Präparat B) wurde wie A behandelt. Ihr annäherndes Gewicht war 0,27 g.

Analysen.

	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Protamin-Fällung					
	Gew. mg	Vol. ccm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gewicht an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %	Mittel %
Präparat A	144,2	100	5,3 5,2	5,1 5,1	149,9 147,0	154,5	100	97,0 95,2	95,6
	76,2	100	13,3	8,1	125,1	66,1	50	94,6	
Präparat B	61,5	50	7,3 6,9	5,5 5,1	163,3 166,4	42,4	25	96,3 98,1	97,2

Als Übersicht mag folgende Zusammenfassung der Resultate dienen:

	Hb-Gehalt %
A. Das Dekantat enthielt Protamin (IV)	75,1
B. Das Dekantat enthielt kein Protamin.	
I. Die Protaminsulfatlösung war mit der Hälfte der berechneten Menge NaOH versetzt (V, A) . . .	95,6
II. Die Protaminsulfatlösung war mit der für das vollständige Ausfällen beider Komponenten ausreichenden Menge NH_3 versetzt (V, B)	97,2
III. Die Protaminsulfatlösung war mit der berechneten Menge NaOH versetzt.	
1. Das Hämoglobin war während des Fällens dauernd im Überschuß anwesend.	
Eine Protaminlösung wurde einer Hämoglobinlösung zugetröpfelt. Die Fällung wurde	
direkt getrocknet (I, A)	94,9
nach Lösen und Wiederfällen getrocknet (I, B)	94,6
2. Das Hämoglobin war schließlich im Überschuß anwesend.	
a) Einer Hämoglobinlösung wurde eine Protaminlösung zugetröpfelt. Die Fällung wurde	
direkt getrocknet (II, A)	95,2
nach Lösen und Wiederfällen getrocknet (II, B)	95,9
b) Eine Hämoglobinlösung wurde einer Protaminlösung rasch zugesetzt (III)	94,9

Aus der obenstehenden Zusammenfassung der Analysenresultate ist ersichtlich, daß die Fällung, wenn für das quantitative Ausfällen des Protamins hinreichende oder noch größere Mengen von Hämoglobin angewandt worden sind, eine konstante Zusammensetzung von ca. 95 % Hämoglobin und 5 % Protamin hat, unabhängig von der Art und Weise des Fällens.

Wenn dagegen das Protamin im Überschuß ist, kann man Niederschläge mit weit höherem Protamingehalt erhalten. Außer dem Versuche IV habe ich andere, jedoch nicht analysierte Fällungen mit dauerndem Protaminüberschuß hergestellt, die, der Farbe nach, einen noch höheren Protamingehalt besaßen.

Beim Versuche V setzte ich vor dem Fällen zur Protaminsulfatlösung nur halb soviel Alkali[1]) zu, als der Schwefelsäure des Protaminsulfats entsprach. Man konnte dann ebenfalls eine Fällung mit geringerem Hämoglobingehalt erwarten, da das Protamin eine mehrsäurige Base ist und eventuell nur mit einigen der basischen Gruppen das Hämoglobin binden könnte, während die übrigen durch die Schwefelsäure neutralisierten Gruppen die Fähigkeit zur Eiweißfällung entbehren könnten. Dies war indessen, wie aus den Analysenresultaten hervorgeht, nicht der Fall: die Fällung besaß den gleichen Hämoglobingehalt wie bei den vorhergehenden Versuchen, nämlich ca. 95 %. Dagegen entstand nicht mehr als die Hälfte der Fällung, die der angewandten Protaminmenge entspricht. Die andere Hälfte trat erst nach weiterem Alkalizusatz auf. Diese Tatsache dürfte in folgender Weise zu deuten sein: Eine Eiweißfällung kann überhaupt erst eintreten, nachdem eine gewisse Anzahl der 10 oder 12 Säurebindungseinheiten des Protamins frei geworden sind; durch diese freien basischen Gruppen wird bei hinreichender Anwesenheit von Hämoglobin immer eine bestimmte Menge dieses Stoffes gebunden.

Die Tatsache, daß nach Zusatz der halben Menge Alkali die halbe Protaminsulfatmenge für die Eiweißfällung benutzt wird, zeigt weiter, daß die Anzahl der eben erwähnten Säurebindungseinheiten — wenigstens ungefähr — mit der Gesamtzahl der dem Protamin eigenen Säurebindungseinheiten zu-

---

[1]) Berechnet nach dem Gewicht der an der Luft getrockneten Substanz, also einen geringen Überschuß.

sammenfällt. Danach würde also Protamin ausschließlich als freie Base die Fähigheit zur Eiweißfällung besitzen.

Die Histonfällung.

Hämoglobin ist ebenfalls durch und zusammen mit Histon gefällt worden. Dieser Niederschlag ist vorher von Malengreau[1]) hergestellt worden. Er hat ihn jedoch nicht analysiert, behauptet aber, durch qualitative Versuche nachgewiesen zu haben, daß derselbe eine chemische Verbindung sei. Seine Beweise sind die folgenden:

1. Beim Auswaschen der Fällung mit Wasser behält sie ihre hellrote Farbe unverändert.

2. Beim Lösen der Fällung und nachherigem Aussalzen der Lösung mit Ammoniumsulfat bei Halbsättigung fallen Histon und Hämoglobin zusammen, obgleich Hämoglobin allein bei dieser Salzkonzentration völlig löslich ist.

Nach Malengreau sollen die von ihm studierten Eiweißniederschläge nur in genau neutralisierten Eiweißlösungen zustande kommen. Die Histon-Hämoglobin-Fällung erfordert jedoch nach meinen Erfahrungen alkalische Reaktion, um zustande zu kommen, und dieses Verhalten macht das Studium derselben viel schwerer als das der entsprechenden Protaminfällung. Das Histon wird ja im Gegensatz zu Protamin bei schwach alkalischer Reaktion ausgefällt.

Huiskamp[2]) behauptet, daß es notwendig sei, eine Histonlösung salz- und säurefrei zu dialysieren, um sie durch Ammoniak fällen zu können. Andere Verfasser haben dies bestritten. Ich habe das Verhalten nicht untersucht, habe aber stets gefunden, daß die Histonlösung durch Ammoniak fällbar ist, obwohl die gegenwärtigen Salze das Histon gewissermaßen vor dem Ausfallen schützen, so daß man zu einer salzhaltigen Lösung bedeutende Mengen Ammoniak zufügen kann, ohne daß ein sichtbarer Niederschlag entsteht. Anfangs habe ich meine Präparate aus einer solchen Lösung hergestellt. Es hat sich jedoch erwiesen, daß, wenn diese schwach alkalisch reagierende Histonlösung (nicht: Histon im Überschuß von Alkali gelöst) eine Zeitlang in Ruhe gelassen wird, ein Niederschlag ein-

[1]) Le Cellule 21, 121, 1903.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 145, 1901.

tritt. Man muß also annehmen, daß das Histon nie ganz gelöst, sondern wenigstens zum Teil nur fein suspendiert gewesen ist, und weiter, daß es in diesem Zustande von der entstandenen Histon-Hämoglobin-Fällung leicht mitgerissen wird, wodurch sich auch die variierenden Werte meiner Analysen erklären.

Auch beim Auswaschen der Fällung machten sich Schwierigkeiten bemerkbar. Dieselbe löst sich wie der Protaminhämoglobinniederschlag bei neutraler Reaktion in Wasser auf. Man muß also, um große Verluste zu vermeiden, beim Auswaschen ein wenig Alkali hinzusetzen, wie ich es auch mit den Protaminfällungen getan habe. Wird aber ein wenig mehr als die soeben ausreichende Menge zugesetzt, so wird die Fällung zerlegt, und das Hämoglobin allein geht, mindestens zum größten Teil, in Lösung. Ein analoges Verhalten macht sich beim Lösen und Wiederfällen des Niederschlags geltend. Bei einem kleinen Überschuß an Ammoniak wird das Histon augenscheinlich allein gefällt, und es entsteht ein Niederschlag mit viel weniger Hämoglobin als der ursprüngliche.

Meine ersten Analysenpräparate sind, wie erwähnt, aus einer salzhaltigen ammoniakalischen Histonlösung hergestellt worden, und weiter sind sie ohne besondere Vorsichtsmaßregeln gelöst und wieder gefällt. Sie zeigen auch eine sehr unregelmäßig wechselnde Zusammensetzung. Ich will jedoch hier ihre Herstellung und Zusammensetzung anführen.

I und II.

Diese zwei Präparate sind genau auf dieselbe Weise hergestellt worden. Eine alkalische Histonlösung wurde zu einer Hämoglobinlösung bis zum Auftreten des Niederschlags gesetzt.

Analysen.

	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Histon-Fällung					
	Gew. mg	Vol. ccm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gehalt an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %	Mittel %
Präparat I	125,6	100	5,3 7,5	7,1 10,3	93,8 91,5	73,5	50	63,8 62,2	63,0
Präparat II	90,7	100	10,8 11,1	9,2 10,1	101,5 99,7	151,6	100	67,0 65,8	66,4

Dieser wurde abzentrifugiert, gewaschen, in essigsäurehaltigem Wasser gelöst, wieder gefällt, mit ausgekochtem Wasser gewaschen, mit Alkohol und Äther behandelt und danach bei 100° getrocknet.

III und IV.

Diese Präparate sind wie die vorigen hergestellt worden, jedoch nicht gelöst und wieder gefällt, nur mit ammoniakhaltigem Wasser gewaschen.

Analysen.

	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Histon-Fällung					
	Gew. mg	Vol. ccm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gehalt an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %	Mittel %
			10,3	14,6	67,7			62,9	
Präparat III	96,0	100	9,1	13,3	65,7	107,8	100	60,9	61,4
			7,0	10,3	65,2			60,5	
Präparat IV	110,0	100	10,3	12,9	87,8	62,8	50	69,9	70,5
			8,2	10,1	89,3			71,1	

V und VI.

Eine Histonlösung wurde mit einem Minimum von Ammoniak versetzt, um mit Hämoglobin eben eine Fällung geben zu können, und danach geteilt, um zu den Präparaten V und VI verwendet zu werden. Hämoglobin wurde zu diesen beiden im Überschuß gesetzt. Die Fällungen wurden gewaschen und in je 2 Teile, A und B, geteilt. V und VI A wurden direkt, V und VI B nach vorausgegangenem Auflösen und Wiederfällen getrocknet.

Analysen.

	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Histon-Fällung					
	Gew. mg	Vol. ccm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gehalt an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %	Mittel %
Präparat V A	121,1	100	10,3	11,0	113,4	96,0	50	59,1	59,3
			10,1	10,7	114,3			59,5	
Präparat V B	121,1	100	10,1	20,5	59,7	107,3	100	55,6	55,6
			9,9	20,1	59,6			55,6	
Präparat VI A	61,5	50	6,3	12,6	61,5	60,8	50	50,6	52,3
			6,5	13,1	65,6			53,9	
Präparat VI B	121,1	100	10,1	24,2	50,5	121,2	150	62,6	64,3
			8,1	18,4	53,5			66,0	

VII bis XII.

Die nächsten 6 Präparate sind alle auf dieselbe Weise, aber jedes für sich allein, hergestellt worden. Ich hatte schon vor der Herstellung derselben die Nachteile der Anwendung einer alkalisch reagierenden Histonlösung bemerkt und habe mich darum einer anderen Methode bedient. Ich habe dabei den Umstand benutzt, daß die Histon-Hämoglobin-Fällung dieselbe Eigenschaft wie die entsprechende Protaminfällung besitzt, durch Überschuß an Hämoglobin gelöst zu werden und aus dieser Lösung durch Verdünnen mit Wasser wieder ausgefällt zu werden. Durch Ammoniakzusatz machte ich zuerst meine Hämoglobinlösung schwach alkalisch, was das Hämoglobin nicht schädigte; die Lösung zeigte nämlich die ganze Zeit ein reines Oxyhämoglobinspektrum. Zu dieser Lösung wurde eine genau neutralisierte Histonlösung gesetzt. Man konnte dabei keine Spur einer Fällung wahrnehmen, und eine solche trat auch nicht beim Stehen ein; die Lösung war ganz klar. Beim Verdünnen trat die Fällung jedoch hervor und hatte das charakteristische hellrote Aussehen. Wurde aber neutralisiertes Histon mit Hämoglobin ohne Ammoniak versetzt und darauf die Mischung durch Wasser verdünnt, so kam kein Niederschlag zustande. Die alkalische Reaktion ist also nicht zu umgehen. Leider sind diese Präparate gelöst und ohne besondere Vorsichtsmaßregeln gefällt worden, so daß die oben erwähnten Fehler doch hier in Betracht kommen. Sie zeigen auch die unregelmäßigen Variationen in ihrer Zusammensetzung wie die vorher beschriebenen Präparate.

Analysen.

	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Histon-Fällung				
	Gew. mg	Vol. ccm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gehalt an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %
Präparat VII	56,0	100	15,1	11,9	71,1	51,7	50	68,7
Präparat VIII	56,0	100	15,1	19,4	43,6	70,8	100	61,6
Präparat IX	56,0	100	15,1	8,2	103,1	68,7	50	75,0
Präparat X	56,0	100	15,1	13,6	62,2	101,3	100	61,4
Präparat XI	63,7	100	10,1	36,4	17,7	34,4	50	25,7
Präparat XII	63,7	100	10,1	25,9	24,8	46,2	50	26,9

XIII und XIV.

Zu 10 ccm einer gesättigten Hämoglobinlösung, mit 0,15 ccm 10%igem Ammoniak versetzt, wurden 10 ccm einer verdünnten neutralen Histonlösung und darauf 100 ccm Wasser hinzugefügt, wobei eine Fällung entstand. Diese wurde mit ausgekochtem Wasser gereinigt und dann wie die vorher erwähnten getrocknet.

Analysen.

	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Histon-Fällung				
	Gew. mg	Vol. ccm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gehalt an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %
Präparat XIII	53,1	100	25,1	11,1	120,1	45,6	25	65,8
Präparat XIV	53,1	100	25,1	22,0	60,6	48,5	50	62,4

XV und XVI.

Diese Präparate wurden wie die vorigen hergestellt; jedoch wurden 200 anstatt 100 ccm Wasser angewandt.

Analysen.

	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Histon-Fällung				
	Gew. mg	Vol. ccm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gehalt an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %
Präparat XV	53,1	100	25,1	16,8	79,3	59,1	50	67,1
Präparat XVI	53,1	100	25,1	19,4	68,7	56,2	50	61,2

XVII bis XXII.

Diese Präparate wurden ebenfalls wie die Präparate XIII und XIV hergestellt, mit Ausnahme davon, daß die Histon- und Hämoglobinlösungen im Verhältnis 2 : 3 (10 und 15 ccm) gemischt wurden und daß der Alkaligehalt der Hämoglobinlösung variiert wurde. Bei den Versuchen XVII und XVIII wurden 0,05 ccm, bei XIX und XX 0,1 und bei XXI und XXII 0,15 ccm 10%iges Ammoniak zugesetzt. Bei XIX bis XXII wurde ein winziger Niederschlag schon vor dem Verdünnen beobachtet, der jedoch nachher größer wurde. In allen Fällen

konnte im Filtrat nach Zusatz von wenig Ammoniak und Verdünnen mit Wasser noch ein Niederschlag erhalten werden.

Analysen.

	Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Histon-Fällung				
	Gew. mg	Vol. ccm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Höhe d. Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gehalt an Hb per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Vol. ccm	Ber. Gehalt an Hb %
Präparat XVII	61,0	100	15,1	22,0	41,8	64,0	100	65,3
Präparat XVIII	61,0	100	15,1	20,6	44,7	68,0	100	65,8
Präparat XIX	61,0	100	15,1	20,8	44,3	70,6	100	62,7
Präparat XX	61,0	100	15,1	18,2	50,6	75,5	100	67,0
Präparat XXI	61,0	100	15,1	19,6	47,0	73,7	100	63,7
Präparat XXII	61,0	100	15,1	18,2	50,6	77,2	100	65,6

Außer den hier angeführten habe ich ein Präparat mit Überschuß an Histon hergestellt und analysiert; das Resultat war etwa 20% Hämoglobin. Die Bestimmung war vor dem genauen Ausarbeiten meiner analytischen Methode gemacht worden, und der Wert ist darum nur ein angenäherter. Auch andere ebenso hergestellte Präparate hatten der Farbe nach etwa diese oder noch hämoglobinärmere Zusammensetzung. Also liegt hier eine Analogie zum Protaminniederschlag vor.

Die Analysenresultate können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

	Hämoglobingehalt %
A. Mit alkalisch reagierenden Histonlösungen hergestellte Präparate.	
I. Histon allein im Filtrate	ca. 20
II. Hämoglobin im Filtrate.	
1. Eine Histonlösung wurde der Hämoglobinlösung zugetröpfelt. Die Fällung wurde:	
a) direkt getrocknet (I, II)	63,6; 66,4
b) nach Lösen und Wiederfällen getrocknet (III, IV)	61,4; 70,5
2. Eine Hämoglobinlösung wurde der Histonlösung zugesetzt. Die Fällung wurde	
a) direkt getrocknet (V A, VI A)	59,3; 52,3
b) nach Lösen und Wiederfällen getrocknet (V B, VI B)	55,6; 64,3

	Hämoglobin-gehalt %
B. Mit alkalisch reagierenden Hämoglobinlösungen hergestellte Präparate.	
I. Die Präparate wurden nach Lösen und Wiederfällen getrocknet (VII bis XII)	68,7; 61,6; 75,1; 61,4; 25,7; 26,9
II. Die Präparate wurden direkt getrocknet:	
1. 1 Teil Hämoglobinlösung + 1 Teil Histonlösung + 10 Teile Wasser (XIII, XIV) . .	65,8; 62,4
2. 1 Teil Hämoglobinlösung + 1 Teil Histonlösung + 20 Teile Wasser (XV, XVI) . .	67,1; 61,2
3. 3 Teile Hämoglobinlösung + 2 Teile Histonlösung + 20 Teile Wasser. Die Hämoglobinlösung war mit	
a) 0,01 Teilen NH_3 versetzt (XVII, XVIII)	65,3; 65,8
b) 0,02 Teilen NH_3 versetzt (XIX, XX) . .	63,8; 67,0
c) 0,03 Teilen NH_3 versetzt (XXI, XXII) .	63,7; 65,6

Wie oben erwähnt, finde ich, daß man aus den Versuchen I bis XII wegen ihrer ungeeigneten Darstellungsweise keine Schlüsse ziehen kann, und ich habe sie nur der Vollständigkeit halber angeführt. Die übrigen Präparate zeigen eine gute Übereinstimmung ihrer Zusammensetzung. Es muß jedoch hervorgehoben werden, daß nur Verdünnung und Alkaligehalt bei der Herstellung variiert worden sind. Das Hämoglobin, worin ja die Fällung anfangs gelöst ist, muß aus diesem Grunde im großen Überschuß vorhanden sein, und ist nur in geringem Maße variiert worden.

Einen unzweideutigen Beweis, daß ein Niederschlag mit konstanter Zusammensetzung ebenso wie durch Protamin auch durch Histon zu erhalten ist, liefern die Analysen-Resultate freilich nicht, sie wiesen jedoch in diese Richtung hin, obwohl hier mehrere Nebenerscheinungen entstehen, und es darum mit großen Schwierigkeiten verknüpft ist, die Fällung rein zu erhalten.

In dieselbe Richtung zeigt auch das Verhalten, daß die qualitativen Reaktionen der Niederschläge große Ähnlichkeiten mit der Hämoglobin-Protamin-Fällung aufwiesen. Beide sind

sie nämlich in Wasser bei neutraler Reaktion löslich im Gegensatz zu dem Ammoniakniederschlag des Histons. Diese Lösung wird durch Natriumpikrat und Ammoniumsulfat gefällt und die dabei entstandenen Fällungen sind den ursprünglichen ganz ähnlich. Die Fällungen sind weiter beide in Hämoglobin löslich und werden beide durch Ammoniakzusatz oder durch Verdünnen mit Wasser stark gefällt.

Die Zusammensetzung des Histon-Hämoglobin-Niederschlags kommt dem Verhältnis: ein Teil Histon zu zwei Teilen Hämoglobin nahe.

Die Caseinfällung.

Ein drittes Fällungsmittel für Hämoglobin war Casein. Casein in Alkali gelöst wirkt aber nicht auf Hämoglobin fällend ein. Man muß es darum auf andere Weise (Bang[1]) in Lösung bringen. Die Casein-Alkali-Lösung wurde mit Salzsäure versetzt, bis das anfangs ausgeschiedene Casein wieder gelöst wurde. Die Lösung wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gefällt, die abfiltrierte Fällung in lauwarmem Wasser gelöst, wieder durch Natriumchlorid gefällt und dies so oft wiederholt, bis die abgesogene Salzlösung neutral reagierte. Die Fällung selbst reagierte immer noch sauer. Vom Kochsalz wurde die Fällung so weit wie möglich durch Pressen zwischen Filtrierpapier befreit, die Lösung war jedoch noch salzhaltig.

Wird jetzt Hämoglobin zu dieser Lösung tropfenweise zugesetzt, so entsteht augenblicklich ein hellroter, grobkörniger Niederschlag, der jedoch nach ein- oder zweimaligem Auswaschen mit Wasser rein weiß wird und aus reinem Casein besteht. Wird aber die Caseinlösung zu einer Hämoglobinlösung zugetröpfelt, so entsteht eine Fällung, die sich ganz anders verhält. Anfangs wird sie durch den Überschuß an Hämoglobin gelöst. Nach genügendem Zusatz entsteht jedoch ein dauerhafter Niederschlag, der sich auf dem Boden und an den Wänden des Gefäßes absetzt. Er hat durchaus dasselbe teerartige Aussehen wie die entsprechende Protaminfällung. Er wurde durch Reiben mit Wasser in einer Reibschale gut gereinigt, ohne daß er seine Farbe verlor und ohne daß das

[1]) Bang in Der Harn usw., herausgeg. von Neuberg, S. 1034; 1912.

Waschwasser gefärbt wurde, wenn einmal das dem Niederschlag anhaftende Hämoglobin entfernt war. Hierin sieht man sogleich einen großen Unterschied zwischen diesem Niederschlag und dem vorher erwähnten Niederschlag von durch nur anhaftende Hämoglobinlösung gefärbtem Casein.

Die Fällung ist in schwachem Alkali löslich und bei außerordentlich vorsichtiger Arbeit durch Zusatz einer Säure wieder zu erhalten. Äußerst leicht wird jedoch dabei das Casein allein gefällt. Das Casein allein wird mit Ammoniumsulfat ausgesalzen, es gerinnt durch Zusatz von Calciumchlorid und Lab ganz wie sonst. Das Casein reagiert also in der Lösung der Fällung ganz unabhängig vom Hämoglobin.

Drei Präparate sind dargestellt und analysiert worden.

I.

Zu der Caseinlösung wurde eine Hämoglobinlösung rasch im großen Überschuß gesetzt. Die entstandene Fällung wurde wie die des Protamins gereinigt und getrocknet. Die Analysierung dieses Präparates geschah durch Bestimmung des Hämoglobingehalts, die der folgenden teils hierdurch und teils durch Ermittlung des Phosphorgehalts und darauf folgende Berechnung des Caseingehalts.

Analyse.

Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Casein-Fällung					
Gewicht mg	Volumen ccm	Höhe der Flüssigkeitsschicht mm	Höhe der Flüssigkeitsschicht mm	Ber. Gew. d. Hämoglobins per 100 ccm mg	Abgewogene Menge mg	Volumen ccm	Gehalt an Hb %	Mittel %
72,4	100	13,3	12,3	78,3	118,3	100	66,2	65,6
		10,8	10,1	77,4			65,4	
		12,9	12,1	77,2			65,3	

II.

Zu einer Hämoglobinlösung wurde tropfenweise unter Umrühren die Caseinlösung gesetzt. Das Hämoglobin war die ganze Zeit im Überschuß. Die Fällung wurde gereinigt und getrocknet.

Analyse.

Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Casein-Fällung									
Gew.	Vol.	Höhe d. Flüssigkeitsschicht	Höhe d. Flüssigkeitsschicht	Ber. Gewicht an Hb per 100 ccm	Abgewogene Menge	Vol.	Gehalt an Hb	Mittel	Abgew. Menge	$Mg_2P_2O_7$	P-Gehalt	Cas.-Gehalt
mg	ccm	mm	mm	mg	mg	ccm	%	%	mg	mg	%	%
190,6	100	5,3 3,6 4,8	7,4 5,1 7,1	136,5 134,5 128,8	194,4	100	70,2 69,2 66,3	68,6	716,7	7,3	0,28	33

III.

Zu einer Hämoglobinlösung wurde tropfenweise die Caseinlösung zugesetzt, bis eine große Fällung entstand. Nachdem diese sich abgesetzt hatte, wurde Casein aufs neue hinzugefügt und dieses Verfahren 3 mal wiederholt. Das Hämoglobin war jedoch die ganze Zeit im Überschuß anwesend. Die ganze Fällung wurde gesammelt und wie gewöhnlich weiter behandelt.

Analyse.

Hämoglobin zum Vergleich			Hämoglobin-Casein-Fällung									
Gew.	Vol.	Höhe d. Flüssigkeitsschicht	Höhe d. Flüssigkeitsschicht	Ber. Gewicht an Hb per 100 ccm	Abgewogene Menge	Vol.	Gehalt an Hb	Mittel	Abgew. Menge	$Mg_2P_2O_7$	P-Gehalt	Cas.-Gehalt
mg	ccm	mm	mm	mg	mg	ccm	%	%	mg	mg	%	%
125,3	100	5,3 7,3	8,0 11,2	83,0 81,7	121,8	100	68,1 67,1	67,6	455,4	4,7	0,28	34

Das Verhältnis Hämoglobin zu Casein ist beinahe gleich 2 : 1. Das Verhältnis der Komponenten ist beim Herstellen der Fällung nicht stark variiert worden, immer ist ja ein großer Überschuß an Hämoglobin verwendet worden infolge der Leichtigkeit, mit der reines Casein sich fällen läßt; auch das Lösen und Wiederfällen war hier unmöglich. Die Art der Mischung der beiden Substanzen hatte sich jedoch ohne Einfluß auf die Zusammensetzung der Fällung erwiesen.

II. Die Fällung von Casein durch basisches Eiweiß.

Die Protaminfällung.

Die Protamin-Caseinfällung ist vorher von Hunter[1]) analysiert worden.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 526, 1907.

Beim Herstellen dieses Niederschlags ist es nicht notwendig, das Protamin mit Alkali oder Ammoniak zu versetzen; eine neutrale Protaminlösung fällt sogleich eine neutrale Casein-Alkalilösung. Der Niederschlag ist grobkörnig und weiß; beim Stehen oder noch besser beim Zentrifugieren backt er zusammen zu einer gelbweißen teigartigen Masse, die nach Bang und Hunter in gesättigter Kochsalzlösung und in warmem Wasser löslich, dagegen in kaltem Wasser beinahe unlöslich ist. Im Überschuß von Casein ist die Fällung leicht löslich, und diese Lösung gibt keinen Niederschlag mit den Alkaloidreagenzien. Er ist weiter in verdünntem Alkali ziemlich schwer löslich und auch daraus durch die Alkaloidreagenzien nicht fällbar.

Drei Präparate sind hergestellt worden, worin der Phosphorgehalt bestimmt wurde. Nach Einführung einer Korrektion für den Phosphorgehalt des Protamins ermittelt man aus den Analysenresultaten den Caseingehalt der Fällung.

I.

Eine neutrale Protaminlösung wurde mit einer äußerst schwach alkalischen Caseinlösung versetzt. Es entstand sogleich eine Fällung, die durch Zentrifugieren gesammelt wurde. Durch mehrmaliges Zerreiben mit Wasser in einer Reibschale und Zentrifugieren wurde sie gereinigt, mit Alkohol und Äther behandelt und bei 100° getrocknet. Die über der Fällung stehende Flüssigkeit enthielt Protamin (Niederschlag durch Natriumpikrat), aber kein Casein (keinen Niederschlag durch Essigsäure). Das Protamin ist also die ganze Zeit beim Fällen im Überschuß gewesen.

Analyse.

Sub. mg	$Mg_2P_2O_7$ mg	P mg	P %	Caseingehalt unkorr. %	Caseingehalt korr. %
768,0	21,5	5,99	0,78	91,8	89,9

Wie ersichtlich, wirkt die Verunreinigung des Protamins durch Phosphor sehr wenig auf die Resultate ein.

II.

Eine Caseinlösung wurde mit Protaminlösung versetzt, und gerade soviel, daß das Zentrifugat die Protaminreaktionen schwach gab. Hier ist also das Casein bis zuletzt im Über-

schuß gewesen. Ich habe jedoch das Fällen beim Caseinüberschuß nicht beendigt, weil aus einer caseinhaltigen Lösung die Fällung schwer abzuscheiden ist. Die Fällung wurde wie die vorige behandelt.

Analyse.

Sub. mg	$Mg_2P_2O_7$ mg	P mg	P %	Caseingehalt unkorr. %	Caseingehalt korr. %
677,2	19,7	5,48	0,81	95,6	94,2

III.

Eine 2mal konzentriertere Protaminlösung, als die zu den vorigen Versuchen angewandte, wurde mit derselben Caseinlösung wie im vorigen Fall versetzt. Das Zentrifugat enthielt noch ein wenig Protamin. Der gereinigte Niederschlag wurde in 2 Teile A und B geteilt. A wurde direkt getrocknet und analysiert, B mit $^1/_2$ ‰ Alkali zerrieben und dadurch zum Teil in Lösung gebracht. Da der Niederschlag schwer löslich war, habe ich die Flüssigkeit schließlich abgegossen und die ungelöste Hauptmasse der Fällung gewaschen und getrocknet. Die abgegossene Flüssigkeit gab beim Sauermachen nur einen spärlichen Niederschlag. Es war also sehr wenig in Lösung gegangen.

Analyse.

	Sub. mg	$Mg_2P_2O_7$ mg	P mg	P %	Caseingehalt unkorr. %	Caseingehalt korr. %
A .	465,5	13,9	3,87	0,83	97,6	97,1
B .	500,6	15,0	4,18	0,83	97,6	97,1

Da die Analyse des Teiles B dasselbe Resultat gibt wie die des Teiles A, so ist also die Fällung nicht durch Alkali in einen leichter und einen schwerer löslichen Teil zu zerlegen.

Das Mittel aus den obigen Zahlen: 90, 94 und 97 % gibt 94 % Casein und 6 % Protamin, also dasselbe Verhältnis wie in der Protamin-Hämoglobin-Fällung. Beim Fällen sind die Proportionen der Komponenten weitgehend variiert worden, doch ist ja die konstante Zusammensetzung unzweifelhaft. Die Analysen zeigen jedoch einen Phosphorgehalt an, der dem des reinen Caseins so nahe kommt, daß man sich fragen kann, ob

das Protamin überhaupt mitfällt. Qualitative Versuche haben jedoch gezeigt, daß das Protamin beim Caseinzusatz allmählich in der Lösung verschwindet, es muß sich also im Niederschlag befinden.

Hunter hat, anstatt meinen 6 % Protamin, 40 % gefunden, was nur durch seine nicht einwandfreie Methode zu erklären ist.

Die Histonfällung.

Auf dieselbe Weise wie Protamin verhält sich Histon zu Casein. Eine Histonlösung schlägt ohne Alkalizusatz eine neutrale Caseinlösung nieder. Die Fällung ist in 0,1 ‰ Alkali und im Überschuß an Casein löslich. Natriumpikrat gibt weder in der einen noch in der anderen Lösung einen Niederschlag. Bei genauer Neutralisation der alkalischen Lösung wird sie milchweiß; der Niederschlag kommt aber erst bei saurer Reaktion zustande. Das Kochen der neutralen salzhaltigen Lösung bewirkt keine Koagulation. Calciumchlorid in geringen Mengen fällt quantitativ, Überschuß daran löst. Calciumcarbonat in Substanz löst den Niederschlag nicht, wie es mit reinem Casein der Fall ist.

Um zu erfahren, ob die Fällung beim Auflösen in Alkali in ihre Komponenten zerlegt wird, wobei das Casein sich erst lösen sollte, habe ich den ganzen Niederschlag in verdünntes Alkali gebracht, und nachdem die Hauptmasse gelöst war, die Flüssigkeit abgegossen, die Substanz mit Säure gefällt und analysiert. Phosphorgehalt 0,66 %. Der ungelöste Rest wurde gereinigt und getrocknet. Obwohl er nur 150,8 mg wog, habe ich doch eine quantitative Phosphoranalyse gemacht, die 0,6 % Phosphor gab. Der Niederschlag ist also nicht gespalten worden.

Ich habe 6 Analysenpräparate hergestellt.

I.

Eine Histonsulfatlösung wurde mit einer Caseinlösung versetzt. Der Niederschlag wurde in Wasser aufgeschlemmt, durch Zutröpfeln von $^{n}/_{2}$-Alkali gelöst, wieder durch Essigsäure gefällt, gewaschen und getrocknet. Das Zentrifugat enthielt spurenweise Histon. Auch hier ist vor der Ausrechnung des Caseingehalts eine Korrektion für die Verunreinigung des Histon-

präparates durch Phosphor auszuführen. Mit dem zu den drei ersten Versuchen angewandten Histon ist jedoch keine Phosphorbestimmung gemacht worden. Ich habe darum denselben Wert für den Phosphorgehalt dieses Präparates, wie bezüglich für das später angewandte Histonpräparat gefunden, verwendet.

Analyse.

Sub. mg	$Mg_2P_2O_7$ mg	P mg	P %	Caseingehalt unkorr. %	Caseingehalt korr. %
581,5	14,8	4,12	0,71	83,5	78,4

II.

Eine Caseinlösung (schwach alkalisch) wurde mit einer schwach sauren Histonchloridlösung versetzt. Die Fällung wurde zweimal gelöst und wieder gefällt. Das Zentrifugat enthielt Casein.

Analyse.

Sub. mg	$Mg_2P_2O_7$ mg	P mg	P %	Caseingehalt unkorr. %	Caseingehalt korr. %
673,2	18,0	5,01	0,74	87,1	83,1

III.

Dieses Präparat wurde ganz wie das vorige hergestellt. Das Zentrifugat war eiweißfrei.

Analyse.

Sub. mg	$Mg_2P_2O_7$ mg	P mg	P %	Caseingehalt unkorr. %	Caseingehalt korr. %
610,4	16,0	4,45	0,73	85,9	81,5

IV.

Zu einer Histonlösung wurde eine Caseinlösung gefügt. Der entstandene Niederschlag wurde einmal gelöst und wieder gefällt.

Analyse.

Sub. mg	$Mg_2P_2O_7$ mg	P mg	P %	Caseingehalt unkorr. %	Caseingehalt korr. %
402,3	9,6	2,67	0,66	77,6	70,8

V.

Zu einer neutralen Histonlösung wurde eine Caseinlösung gefügt. Das Zentrifugat enthielt spurenweise Histon. Der Niederschlag wurde gewaschen und in zwei Teile A und B geteilt. A wurde direkt, B nach vorausgegangener Auflösung in $^{1}/_{2}\,^{0}/_{00}$ Alkali und quantitativer Wiederfällung getrocknet.

Analyse.

	Sub. mg	$Mg_2P_2O_7$ mg	P mg	P %	Caseingehalt unkorr. %	Caseingehalt korr. %
A	280,0	7,6	2,12	0,75	88,2	84,6
B	618,9	14,6	4,06	0,66	77,6	70,8

VI.

Zu einer Caseinlösung wurde eine neutrale Histonlösung gefügt. Die Fällung wurde wie die vorige behandelt; das Zentrifugat enthielt spurenweise Casein.

Analyse.

Sub. mg	$Mg_2P_2O_7$ mg	P mg	P %	Caseingehalt unkorr. %	Caseingehalt korr. %
431,6	10,4	2,90	0,67	78,8	72,3
304,3	6,3	1,75	0,58	68,2	58,5

Übersicht.

	Caseingehalt %
A. Histon im Überschuß.	
a) Die Fällung wurde gelöst und wieder gefällt (I, IV, V A)	78, 71 (85)
b) Die Fällung wurde direkt getrocknet (V B)	71
B. Casein im Überschuß.	
a) Die Fällung wurde gelöst und wieder gefällt (II, III, VI A)	83, 82, 72
b) Die Fällung wurde direkt getrocknet (VI B)	(58,5)

Die eingeklammerten Werte sind deshalb nur approximativ, weil die gefundene Phosphormenge sehr klein ist, nur ca. 2 mg. Ein Mittel aus den obigen Zahlen gibt 76 % Casein; wenn man nur die drei letzten Zahlen, in denen das Histon bezüglich seines Phosphorgehalts analysiert ist, mitrechnet, ergibt sich als Resultat 71 % Casein und 29 % Histon.

Robertson hat dieses Jahr eine Untersuchung veröffentlicht (Journ. of Biol. Chem. 18, 499, 1913), in der er die Herstellung und Analysierung durch Phosphorbestimmung von einer Globin-Casein-Fällung beschreibt, in der er zwei Teile Globin und einen Teil Casein gefunden hat. Das Globin wird (Schulz, Zeitschr. f. Physiol. 24, 449, 1898) zu den Histonen gerechnet.

Die erhaltenen Resultate können in folgender Weise zusammengefaßt werden:

1. Die Niederschläge sind bezüglich ihrer Zusammensetzung innerhalb gewisser Grenzen konstant, nämlich:

a) die Hämoglobinniederschläge bei einem Überschuß an Hämoglobin oder bei Gegenwart der zum quantitativen Ausfällen des basischen Eiweißes eben ausreichende Menge. Im letzteren Falle ist auch das Hämoglobin quantitativ im Niederschlag zu finden;

b) die Caseinniederschläge sowohl bei Überschuß an Casein als an basischem Eiweiß. Durch richtige Proportionen der beiden Komponenten werden sie beide quantitativ niedergeschlagen.

2. Die Zusammensetzung ist von der Art und Weise des Fällens unabhängig.

3. Überschuß an nicht basischem Eiweiß löst den Niederschlag auf.

4. Aus der Lösung der Komplexe lassen sich die Komponenten durch Fällungsmittel nicht trennen. Ausnahme: die Hämoglobin-Casein-Fällung.

Eiweißstoffe treten bekanntlich als sog. Emulsionskolloide auf. Das Verhalten kolloidaler Lösungen unter chemischen und physikalischen Einflüssen ist in letzter Zeit mehrfach eingehend studiert worden. Diese Studien galten indessen hauptsächlich den Suspensionskolloiden. Die Emulsionskolloide sind bedeutend weniger genau bekannt, was auf den großen Schwierigkeiten beruht, die mit der Untersuchung derselben verknüpft sind. Eine ganze Gruppe derselben, die Eiweißstoffe, können nämlich meist überhaupt nicht in reinem Zustande als einheitliche Stoffe erhalten werden. Ferner werden die Untersuchungen der Emulsionskolloide erschwert durch ihre Labilität und die große Zahl ihrer reagierenden Gruppen.

Absorptionsversuche mit festen Stoffen als Adsorbens sind ausgeführt worden, nämlich von Freundlich[1]) u. a. mit Farbstoffen an Baumwolle und Seide und von Wislicenus[2]) mit Tannin und Dextrin an Tonerde, ferner von N. Carli[3]) mit kolloidalem Eisenhydroxyd an Kohle. Die von Freundlich, Wislicenus u. a. untersuchten Stoffe stehen auf der Grenze zu den echten Lösungen und folgen der Formel für die Absorption der Krystalloide. Für Eisenhydroxyd, das sich den Suspensionskolloiden nähert, fand Carli, daß die Adsorption der Kohlenmenge direkt proportional war, und vom Volumen der Lösung wie von der in Lösung vorhandenen Menge Kolloid unabhängig ist.

Die Einwirkung eines Emulsionskolloides auf ein Suspensionskolloid hängt von den gegenseitigen Mengenverhältnissen ab. Nach Friedemann[4]) sollten nämlich Emulsionskolloide fällend wirken, wenn sie in relativ geringen Mengen zugesetzt werden, in großen Mengen üben sie eine Schutzwirkung auf die unbeständigeren Suspensionskolloide aus und verleihen diesen ihre Eigenschaft, relativ unempfindlich gegen die Einwirkung von Salzen zu sein.

In betreff der gegenseitigen Einwirkung von Emulsionskolloiden wissen wir, daß sie sich oft gegenseitig ausfällen und daß entgegengesetzte Ladungen der beiden Sole die Ausfällung begünstigen, sowie daß bei Präcipitin und Eiweiß die Mischungsgeschwindigkeit in bezug auf die Vollständigkeit der Ausfällung eine Rolle spielt.

Es ist somit sehr wenig bekannt über die Einwirkung der Emulsionskolloide aufeinander. Zur Beurteilung der Vorgänge, die bei den oben beschriebenen Eiweißfällungen vorliegen, kann es daher geeignet sein, dieselben mit den der in dieser Hinsicht mehr bekannten Solen, nämlich den Suspensionskolloiden, bei der Mischung zu vergleichen. Man ist der Ansicht, daß solche Ausfällungen auf Adsorption beruhen. Freundlich[5])

---

[1]) Capillarchemie 1909, 149 u. f.

[2]) Zeitschr. f. Chem. u. Industr. d. Kolloide. 2. Supplem.-Heft II, S. 11, 1908. Zitiert nach Freundlich, Capillarchemie S. 394.

[3]) Zeitschr. f. physikal. Chem. 85, 2, 263, 1913.

[4]) Arch. f. Hygiene 15, 376, 1906. Zitiert nach Freundlich, Capillarchemie S. 450.

[5]) Capillarchemie 1909, 444.

schildert dieses Ausflockungsphänomen auf folgende Weise: „Setzt man zu einer gegebenen Menge eines Soles von gegebenem Gehalt gleiche Mengen eines anderen entgegengesetzt geladenen von wechselndem Gehalt, so findet man, daß sowohl bei sehr kleinem als bei sehr großem Gehalt praktisch keine Ausflockung erfolgt, während bei einem mittleren Gehalt die Ausfällung mehr oder weniger vollständig ist... Die ausgefällten Flocken enthalten stets beide Stoffe in wechselndem Verhältnis"; ein strengerer gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen dem Gehalt des einen Stoffes in den Flocken und den in dem zurückbleibenden Sol ist nicht entdeckt worden, weil die Schnelligkeit des Vermengens u. dgl. eine große Rolle spielt. Der Fällungsvorgang dürfte nämlich ganz anders verlaufen, wenn man die beiden Sole tropfenweise zueinander setzt, als wenn die Mischung rasch erfolgt. Anstatt Ausflockung erhält man im ersteren Falle zuweilen nur Trübung, und es ist dann von dem einen Sol vielmehr zur Ausflockung notwendig. Freundlich ist weiter der Ansicht, daß die gegenseitige Flockung der Suspensionskolloide durchaus den Charakter des Ausfällens durch Elektrolyte hat.

Was die Absorptionserscheinungen deutlich von den chemischen Vorgängen unterscheidet, ist die wechselnde Zusammensetzung der Flocken, die offenbar teils auf den Konzentrationen der Lösungen beruht, teils auf der Art und Weise der Mischung. Was nun die oben beschriebenen Eiweißfällungen betrifft, so hat die Fällung von Casein-basischem Eiweiß unabhängig von diesen Faktoren eine konstante Zusammensetzung und unterscheidet sich dadurch deutlich von vorher bekannten Absorptionsphänomenen zwischen Solen. Die Fällung Hämoglobin-basisches Eiweiß besitzt dagegen nicht im selben Maße konstante Zusammensetzung. Betrachtet man das Phänomen als Adsorption, so kann man es so beschreiben, daß der Punkt für quantitative Adsorption, die bei Gegenwart von relativ geringen Mengen adsorbierten Stoffes einzutreten pflegt, und der Punkt für maximale Adsorption zusammenfallen. Ein derartiger Adsorptionsverlauf ist indessen bei gegenseitigen Einwirkungen von Solen nicht bekannt, der einzige ähnliche Fall ist der erwähnte von Carli untersuchte.

Die quantitativen Analysen der Hämoglobinfällungen können hier somit keine bestimmte Antwort auf die Frage liefern,

ob Adsorption oder chemische Verbindung vorliegt. Mehrere qualitative Reaktionen wie auch die Analogie mit den Caseinfällungen sprechen jedoch für die letztere Deutung. So z. B. die Aussalzung der Lösung der Fällungen mittels Ammoniumsulfat, wobei, wie Malengreau bemerkt hat, das Hämoglobin mitfällt bei einer Konzentration der Salze, die Hämoglobin sonst nicht fällt. Da das Histon sowie das Hämoglobin dabei quantitativ gefällt wird, muß die entstandene Fällung die beiden Komponenten im selben Verhältnis enthalten wie die ursprüngliche, obwohl sie unter anderem Verhältnisse entstanden ist. In der gleichen Weise kann eine geringe Menge Calciumchlorid eine Lösung des Casein-Histon-Niederschlags quantitativ fällen, obwohl sie nicht imstande ist, das Histon allein zu fällen.

Eine gemeinsame Aussalzung der beiden Komponenten kann indessen nicht bewirkt werden aus der Lösung der Casein-Hämoglobin-Fällung, bei der die Bindung zwischen den Komponenten lockerer zu sein scheint. Indessen bietet die Entstehung gerade dieser Fällung einen Vergleich mit dem Fall, wo offenbar nur die eine Komponente fällt und die andere mit sich reißt. Der Unterschied zwischen den beiden vorher beschriebenen Fällungen von Casein-Hämoglobin und von durch Hämoglobin gefärbtem Casein scheint mir zu beweisen, daß im ersten Fall, wie auch in analogen Fällen, die beiden Komponenten miteinander durch chemische Kräfte verbunden sind.

Wie Freundlich ferner hervorgehoben hat, muß für die gegenseitige Ausflockung von Solen durch Adsorption ein gewisses Verhältnis zwischen den Komponenten eingehalten werden. Bei großem Überschuß der einen oder der andern Komponente wird die Ausfällung verhindert bzw. geht die eingetretene Fällung wieder in Lösung.

In dieser Hinsicht stimmen die von mir untersuchten Eiweißlösungen teilweise mit Freundlichs allgemeiner Beschreibung überein, indem ein Überschuß der einen nicht basischen Komponente lösend oder fällungshindernd wirkt. Eine derartige einseitige Einwirkung ist jedoch charakterisch für viele chemische Reaktionen. Ein analoger Fall ist z. B. die Einwirkung von Ammoniak auf eine Kupfersalzlösung. Ein geringer Zusatz erzeugt eine Fällung von $Cu(OH)_2$, bei reichlichem Zusatz löst sich diese Fällung unter Bildung eines komplexen Salzes wieder auf.

In Rücksicht auf alle diese Umstände glaube ich, daß man berechtigt ist, die beschriebenen Fällungen als chemische Verbindungen anzusehen.

Daß die Histon-Hämoglobin-Fällung bezüglich ihrer Zusammensetzung sich unregelmäßiger verhält als die anderen Eiweißfällungen, bildet eher eine Stütze als einen Vorwurf gegen diese Anschauung. Im wesentlichen verhält sich das Histon bei der Eiweißfällung wie bei seinen übrigen Reaktionen wie das Protamin; die Unregelmäßigkeiten deuten aber darauf hin, daß etwas Neues hier noch hinzugekommen ist. Das Histon wird bei der Neutralisation stark opalescierend, was augenscheinlich darauf beruht, daß der Grad der Hydrolyse vergrößert wird, und es bildet sich eine Suspension von freiem Histon, das im Gegensatz zu freiem Protamin unlöslich ist. Ist dies der Fall, so muß hier Adsorption in Frage kommen, und die chemischen Phänomene können sich nicht ungestört abspielen.

Das quantitative Verhältnis zwischen Casein und Hämoglobin in den beschriebenen Fällungen ist von gewissem Interesse. Die Verhältnisse Protamin : Casein und Protamin : Hämoglobin sind nämlich innerhalb der Versuchsfehler dieselben. Für die Verhältnisse Histon : Casein und Histon : Hämoglobin ist dies freilich nicht der Fall, die Ziffern sind jedoch hier weniger exakt, so daß es nicht ganz ausgeschlossen ist, daß es auch hier angenähert so sein kann. In der Verbindung zwischen Hämoglobin und Casein ist das Verhältnis der beiden Komponenten 2 : 1. Man kann aus diesen Tatsachen schließen, daß das Verhältnis der beiden Molekulargewichte dieser Stoffe ein einfaches ist. Das Molekulargewicht des Hämoglobins wird allgemein zu 16 700 gesetzt. Dann stimmen meine Ergebnisse mit Robertsons[1]) Annahme überein, daß das Molekulargewicht des Caseins 17 600 sei. Die Hämoglobin-Caseinfällung würde dann aus 1 Molekül Casein und 2 Molekülen Hämoglobin bestehen, und das Protamin das Vermögen haben, gleich viel Moleküle Hämoglobin und Casein zu binden.

Nach Laqueur und Sackur[2]) hat indessen das Casein ein Äquivalentgewicht von 1135 und ist eine 4 bis 6 basische

---

[1]) Robertson, Die physikal. Chem. d. Proteine 1912.

[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **3**, 193, 1903.

Säure, und hat also ein Molekulargewicht von höchstens 6810. Das Verhältnis zwischen den Molekulargewichten wird dann 2,5. In diesem Falle sollte das Hämoglobin-Casein, um den Analysen zu entsprechen, aus 4 Molekülen Hämoglobin und 5 Molekülen Casein bestehen. (Wenn es aus 1 Molekül Hämoglobin und 1 Molekül Casein bestände, wäre die Zusammensetzung 29% Casein und 71% Hämoglobin, eine Differenz mit den Analysenresultaten 34 bzw. 66%, die außerhalb der Versuchsfehler liegt.) Die Verhältnisse werden also einfacher, wenn man das Robertsonsche Molekulargewicht annimmt.

Die molekulare Zusammensetzung der Protaminniederschläge kann aus den erhaltenen Daten und dem von Kossel und Dakin[1]) für das Salmin gefundenem Molekulargewichte 2045 oder 2454, das wahrscheinlich dem Molekulargewicht des Clupeins naheliegt, nicht ausgerechnet werden. Wenn man nämlich 2, 3 oder 4 Moleküle Hämoglobin auf 1 Molekül Protamin annimmt, erhält man eine Zusammensetzung von 94 bzw. 93, 96 bzw. 95 oder 97 bzw. 96% Hämoglobin, was ja mit den Analysen stimmt.

Wenn man das Molekulargewicht des Histons zu 6122 annimmt, wozu Bang[2]) auf verschiedene Wege gekommen ist, und daraus die Anzahl Casein-Moleküle berechnet, die mit einem Histon-Molekül vereint sein sollten, findet man nach Laqueur und Sackur 2,2, nach Robertson 0,85. Die Zusammensetzung 2 bzw. 1 Caseinmolekül auf 1 Histonmolekül gibt 31 bzw. 26% Histon, welch letztere Zahl mit den Analysen stimmt.

Eine einfache Formel für den Histon-Hämoglobinniederschlag ist nicht zu finden. Die Ausrechnung gibt 0,7 Moleküle Hämoglobin auf 1 Molekül Histon. Mein gefundener Hämoglobingehalt, im Mittel 66% Hämoglobin, ist wahrscheinlich zu klein.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 41, 407, 1904.

[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 4, 348, 1903.

Berichtigung

zu „Kritische Erörterung der Frage der tödlichen Minimaldosis und ihrer Beziehung zum Zeitfaktor“

(diese Zeitschr. 60, 120).

Von

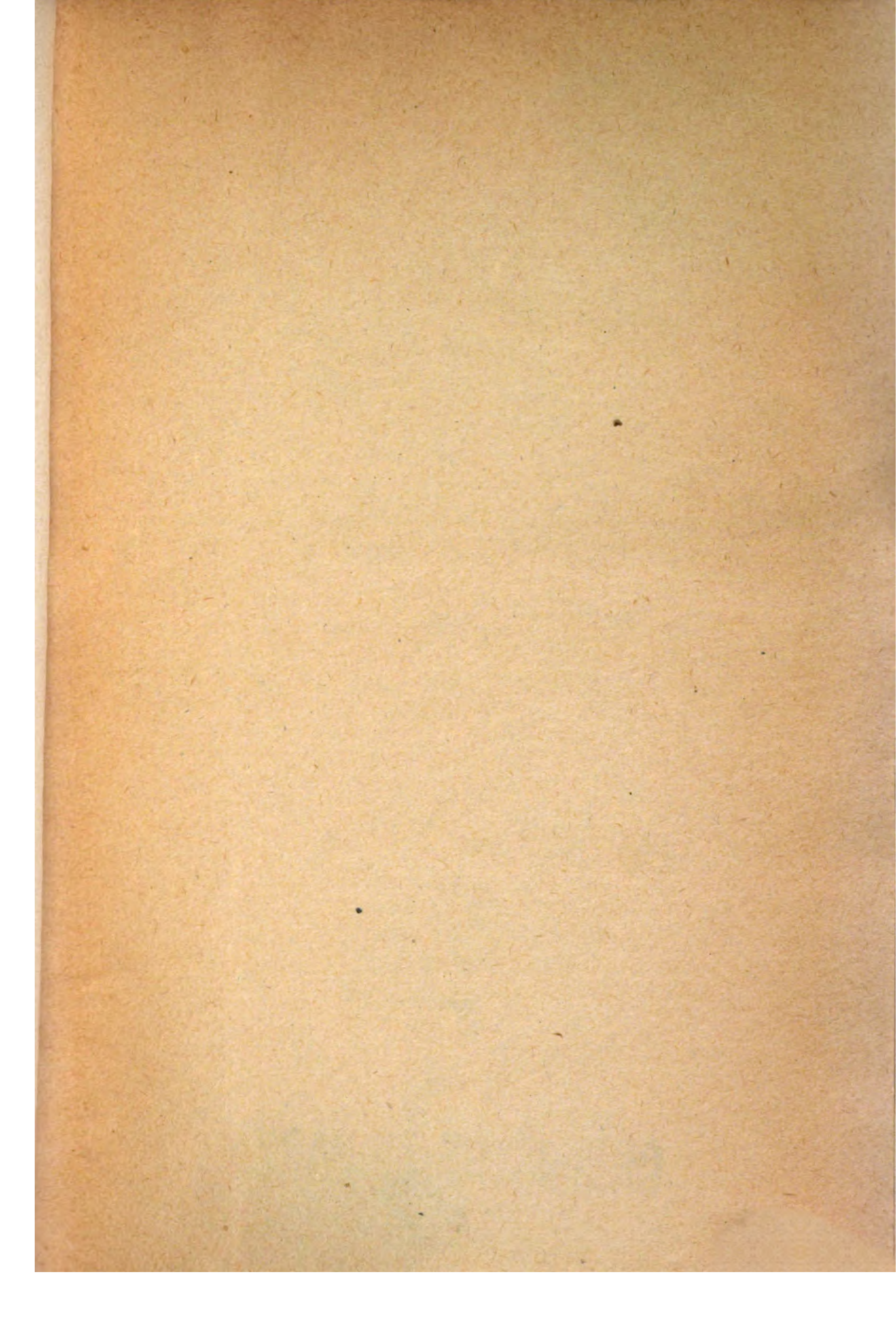
Georges Dreyer und E. W. Ainley Walker.

In Tabelle IV, S. 120 sind die Zahlen in der Rubrik: Dosis (D) im Verhältnis zur Oberfläche $D = \frac{d}{W^{0,72}} \times 10^7$ unrichtig und sollten lauten:

1291
1319
1330
1344
1444
1610
1670

Die fälschlich mitgeteilten Zahlen drücken das Verhältnis zwischen wirklicher Dosis (d) und Gewicht (W) aus, d. h. $\frac{d}{W} \times 10^9$, und gehören nicht unter die Daten dieser Tabelle.

Autorenverzeichnis.




CHEMISTRY LIBRARY

3 2000 013 063 450

